

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg–Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

Interaktionsanalysen verschiedener Alkylantien in vitro als Basis
für Hochdosis-Chemotherapieprotokolle

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg–Essen

Vorgelegt von

Britta Sender, geb. Hoffmann

aus Recklinghausen

2006

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Karl-Heinz Jöckel
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Siegfried Seeber
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Harstrick

Tag der mündlichen Prüfung: 04. August 2006

1. EINLEITUNG.....	5
1.1. DAS MAMMAKARZINOM	5
1.1.1. EPIDEMIOLOGIE	5
1.1.2. ÄTIOLOGIE.....	5
1.1.3. PATHOLOGIE / HISTOLOGIE	5
1.1.4. DIAGNOSTIK	6
1.1.5. PROGNOSE.....	6
1.1.6. THERAPIE.....	6
1.2. ALKYLANTIEN.....	10
1.2.1. ENTWICKLUNG	10
1.2.2. WIRKUNG UND NEBENWIRKUNG	10
1.2.3. RESISTENZEN	12
1.2.4. KOMBINATIONSTHERAPIE	13
1.2.5. HOCHDOSISTHERAPIE.....	14
1.3. ZIEL DER ARBEIT	14
2. MATERIALIEN UND METHODIK	15
2.1. MATERIALIEN	15
2.1.1. ZELLKULTUREN	15
2.1.2. ZYTOSTATIKA.....	16
2.2. METHODIK.....	18
2.2.1. BESTIMMUNG DER ZELLZAHL.....	18
2.2.2. ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS.....	19
2.2.3. INTERAKTIONSANALYSEN	20
2.3. STATISTIK	24
2.3.1. AUSWERTUNG DER ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS	24
2.3.2. AUSWERTUNG DER ISOBOLOGRAMME	24
2.4. MATERIALNACHWEIS.....	25
2.4.1. CHEMIKALIEN.....	25
2.4.2. LABORGERÄTE.....	26

<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>27</u>
3.1. ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS	27
3.1.1. TABELLE DER IC50-WERTE	32
3.2. INTERAKTIONSANALYSEN	32
3.2.1. TABELLE DER INTERAKTIONEN	39
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>40</u>
4.1. MATERIALIEN UND METHODIK	40
4.1.1. ZELLKULTUREN	40
4.1.2. ZYTOSTATIKA	40
4.1.3. ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS	42
4.1.4. DIE INTERAKTIONSANALYSE	43
4.1.5. ZYTOTOXIZITÄT	43
4.1.6. HOCHDOSIS-CHEMOTHERAPIE BEIM MAMMAKARZINOM	47
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT</u>	<u>57</u>
<u>6. ANHANG</u>	<u>58</u>
6.1. QUELLEN	58
6.2. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	72
<u>7. DANKSAGUNG</u>	<u>73</u>
<u>8. LEBENS LAUF</u>	<u>74</u>

1. Einleitung

1.1. Das Mammakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

In den westlichen Industrieländern ist das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung der Frau (22% der Krebserkrankungen der Frau entfallen gegenwärtig auf diesen Tumor) mit einem deutlichen Anstieg der Manifestationshäufigkeit im 5. Lebensjahrzehnt [54,73,78,95].

Mammakarzinome bei unter 20-jährigen sind eine Rarität, ebenso wie der Brustkrebs des Mannes. Eine Zunahme der Morbidität an dieser Erkrankung ist zu beobachten (ca. 28.000 - 40.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und 180.000 neue Brustkrebsfälle jährlich in den USA, mit einer dortigen Sterblichkeitsrate von 44.000 Patientinnen pro Jahr [45,61]), außerdem bestehen erhebliche geographische wie auch ethnische Unterschiede (die Häufigkeit liegt in Nordeuropa wesentlich höher als z.B. in Ostasien; die weiße Bevölkerung ist wesentlich häufiger betroffen als die farbige) [95].

1.1.2. Ätiologie

Die Ätiologie des Mammakarzinoms ist weitestgehend unklar; als Risikofaktoren werden eine familiäre Disposition, Nulliparität, die atypische Mastopathie, eine Menstruationsanamnese mit früher Menarche und später Menopause sowie die Einnahme von Ovulationshemmern bzw. die postmenopausale Östrogen-Langzeittherapie diskutiert [54,73,78,95].

1.1.3. Pathologie / Histologie

Unter dem Begriff Mammakarzinom werden die malignen Tumoren zusammengefaßt, die von den Epithelien der Milchgänge oder der Läppchenazini ausgehen. In 35 - 40 % der postoperativ histologisch untersuchten Tumoren lassen sich Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren nachweisen [4,95].

Aufgrund der histologischen Merkmale lassen sich Low-risk- und High-risk-Tumoren unterscheiden. Als Einstufungskriterien werden die Größe des Primärtumors, der Lymphknoten-Status, das Vorhandensein von Hormonrezeptoren sowie das histologische und zytologische Stadium herangezogen.

Darüber hinaus ist das Vorliegen von Fernmetastasen ein weiterer wichtiger Prognosefaktor.

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen, wobei sich Fernmetastasen am häufigsten (zu 70%) im Knochen (Becken, LWS und Schädel), gefolgt von Lunge (60%), Leber (50%) und Gehirn, finden lassen [78,95].

1.1.4. Diagnostik

Das Standardverfahren zur Diagnosestellung ist die Mammographie. Die Sonographie der Brust erlangt erst bei Tumoren von mehr als 1 cm Durchmesser eine relevante Sensitivität. Die Thermographie ist ebenfalls nur als additive Maßnahme anzusehen, als Screening-Verfahren sind die beiden letztgenannten aufgrund der hohen Fehlerquote ungeeignet [78].

1.1.5. Prognose

Die Prognose des Mammakarzinoms ist unberechenbar, was zum einen an der Irregularität der Metastasierung liegt, die bei Therapiebeginn in der Regel nicht definierbar ist, andererseits liegt es auch am biologischen Verhalten mancher Karzinome: 15 - 20 % der Patientinnen erreichen unbehandelt die 5-Jahres-Überlebensgrenze [54,73,78,95].

Die verschiedensten Kriterien wie die Größe des Primarius, die Histologie, der Rezeptor-Status, insbesondere auch der HER-2/neu-Status, der Lymphknoten-Befall (axillär) und die eventuell bereits erfolgte Fernmetastasierung haben wesentlichen Einfluß auf die Prognose [78,95].

Insgesamt versterben 50 % aller Brustkrebspatientinnen an dieser Erkrankung. Kaum eine Patientin mit metastasiertem Mammakarzinom überlebt diese Erkrankung länger als fünf Jahre [54,61,78].

1.1.6. Therapie

Die operative Therapie des Mammakarzinoms ist die Methode der Wahl, wobei sich die Radikalität des Eingriffs am individuellen prospektiven Risiko orientiert.

Die postoperative Bestrahlung der betroffenen Brust bei brusterhaltender Operation mit 50 - 55 Gy sowie eine zusätzliche Bestrahlung des Tumorbettes mit 10 Gy ist obligat.

An die operative Behandlung des Mammakarzinoms schließt sich dann in der Regel die systemische Therapie in Form der adjuvanten oder palliativen Chemotherapie an [54,73,78].

Ein wesentliches Entscheidungskriterium hierbei in Bezug auf die Indikation und die Art der Chemotherapie ist die individuelle Risikokonstellation einschließlich des nodalen Status der jeweiligen Patientin.

Patientinnen, die älter als 35 Jahre sind, mit einem G1-Tumor kleiner als 1 cm und negativem Lymphknotenstatus erhalten keine adjuvante Chemotherapie, sondern lediglich bei erfolgtem Nachweis von Hormon-Rezeptoren eine anschließende Tamoxifen-Behandlung.

Bei Patientinnen mit einem nodal-negativen Hochrisiko-Karzinom und solchen mit positivem Lymphknotenstatus hingegen besteht die Indikation zu einer adjuvanten Therapie. Hierbei erhalten postmenopausale Hochrisiko- und nodal-positive Patientinnen eine adjuvante Therapie mit CMF und anschließender Gabe von Tamoxifen. Prämenopausale Patientinnen der Hochrisiko-Gruppe und mit axillärer Metastasierung werden in der Regel mit anthrazyklinhaltigen Schemata wie FAC oder FEC oder der initialen Gabe von Adriamycin mit anschließender CMF-Therapie behandelt.

Auch beim metastasierten Mammakarzinom kommen in der Primärbehandlung anthrazyklinhaltige Chemotherapie-Protokolle, zum Teil in Kombination mit Taxanen, zum Einsatz.

Doch gerade bei Patientinnen mit einem ausgedehnteren axillären Befall (> 3 LK) und bei Patientinnen mit Fernmetastasen sind die Ergebnisse der konventionellen Chemotherapie unbefriedigend [42].

In dem Bemühen den betroffenen Patientinnen möglichst lange tumorfreie Intervalle und eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit zu sichern, gab es in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Therapieansätzen.

Nach einer Phase 1-Studie Mitte der Achtziger Jahre mit Hochdosis-Kombinationen von Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU bzw. Melphalan in Verbindung mit der Gabe von autologen Knochenmarkstammzellen als Induktionstherapie beim metastasierten Mammakarzinom, aber auch bei Patienten mit Sarkomen und Melanomen, führte Peters 1993 eine Studie bei Hochrisiko-Patientinnen durch.

Diese Patientinnen erhielten nach einer konventionell dosierten adjuvanten Chemotherapie mit CAF eine Konsolidierungstherapie mit einer Hochdosis-Kombination aus Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU sowie autologen Stammzell-Support. Die Ergebnisse dieser Studien legten den Schluß nahe, dass zum einen ausgewählte Substanzen aus der Gruppe der Alkylantien auch in Kombination in weitgehend maximaler Dosierung verabreicht werden können, bevor nicht-myelosuppressive Nebenwirkungen dosislimitierend relevant werden und dass zum anderen durch die Hochdosis-Konsolidierungstherapie eine Reduktion der Rückfallhäufigkeit im Vergleich zu historischen Studien erzielt werden kann [2,62,64,65].

1995 folgte dann eine vergleichende Untersuchung eines Hochdosis-Therpieregimes mit einer konventionellen Chemotherapie, beides mit Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU, als Konsolidierungstherapie nach einer adjuvanten Therapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin und 5-FU bei Hochrisiko-Patientinnen – das CALGB Protokoll 9082. Der Nachweis eines signifikanten Unterschiedes der beiden Therapieansätze hinsichtlich der Überlebenszeit ließ sich in dieser Studie nicht erbringen [38].

Crown führte Anfang der Neunziger Jahre eine Phase II-Studie mit der Kombination von hochdosiertem Carboplatin und Etoposid durch. Das Patientenkollektiv dieser Studie teilte sich auf in Patientinnen mit chemotherapeutischer Vorbehandlung und solche ohne vorangegangene Therapie. In der nicht vorbehandelten Gruppe wurde eine Remissionsrate von 42% erreicht, während diese Medikamentenkombination als Salvage-Chemotherapie vollständig versagte [24].

Eine weitere Studie mit Etoposid als Monotherapeutikum wurde zur gleichen Zeit von Bezwoda geleitet [10]. Aufgrund der nachgewiesenen Wirksamkeit von Etoposid untersuchte die gleiche Gruppe einige Jahre später eine Kombinationstherapie von Etoposid, Mitoxantron und Cyclophosphamid. In dieser randomisierten Studie wurde die konventionell dosierte Medikamenten-Kombination einer Hochdosistherapie mit den gleichen Wirkstoffen gegenübergestellt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten Gesamtansprechraten von 95% mit einem prozentualen Anteil von Komplettremissionen von 51% in der Gruppe der Hochdosistherapie. Die herkömmlich dosierte Chemotherapie erreichte lediglich eine Gesamtansprechraten von 53% mit einer kompletten Remission in 2% der Fälle [11]. Allerdings stellte sich später heraus, dass die veröffentlichten Daten nicht dem tatsächlich durchgeführten Studienablauf entsprachen, so dass man die gesamte Studie als Fälschung betrachten muß.

Ende der Neunziger Jahre waren unter anderem die Kombinationen von Cyclophosphamid, Doxorubicin und 5-FU sowie Cyclophosphamid, Thiotepa und Cisplatin etablierte Schemata in der Hochdosistherapie des fortgeschrittenen Brustkrebses [22]. Zu dieser Zeit zeichnete sich mit dem Einsatz der Taxane eine weitere vielversprechende Therapiemöglichkeit beim metastasierten Mammakarzinom ab [3,22,23].

1.2. Alkylantien

1.2.1. Entwicklung

Die Ursprünge der heute als Chemotherapeutika eingesetzten Substanzgruppe der Alkylantien liegen bei dem im ersten Weltkrieg als Kampfgas eingesetzten Lost (Dichlordiethylsulfid). Damals durchgeführte Autopsien an gefallenen Soldaten zeigten eine schwere Schädigung aller proliferierenden Gewebe, insbesondere des Knochenmarks [30,57].

Aufgrund dieser Beobachtungen erwog man, den Kampfstoff als Chemotherapeutikum in der Krebstherapie einzusetzen. Der 1942 durchgeführte Versuch, ein Lymphosarkom mit Lost zu therapieren, scheiterte an der hohen Toxizität der Substanz. In dem Bemühen, die Toxizität zu verringern, ging man zunächst zu einer Analogsubstanz, dem Stickstofflost über und veränderte im folgenden die Substituenten am Stickstoff (N-Oxid Bildung / Alkylierung). Diese Veränderungen führten zu einer Verringerung der Basizität, was eine Verminderung der Reaktionsfähigkeit und eine Erhöhung der therapeutischen Breite zur Folge hatte [30,57].

Die heutigen Stickstofflost-Derivate (Cyclophosphamid, Trofosfamid, Ifosfamid, Melphalan, Chlorambucil) sind wesentlich untoxischer als die Ausgangssubstanz und führen bei oraler Applikation nur zu einer geringen lokalen Reizwirkung [57].

Heute werden unter dem Oberbegriff der Alkylantien außer den Stickstofflost-Derivaten auch die Ethylenimin-Derivate (Thiotepa), das Busulfan, das Bendamustin, das Treosulfan, die N-Nitrosoharnstoff-Derivate (Carmustin [BCNU], Lomustin, Nimustin), die Platinkomplexe (Cisplatin, Carboplatin) und im weiteren Sinne auch Procarbazin und Dacarbazin subsummiert.

1.2.2. Wirkung und Nebenwirkung

Bei diesen Substanzen handelt es sich um eine heterogene Stoffgruppe ohne gemeinsame chemische Strukturmerkmale, deren Wirkung vor allem auf der Alkylierung von Nukleinsäuren beruht, wobei dieser Vorgang durch unterschiedliche Reaktionsmechanismen verursacht wird, bedingt durch die ebenfalls variierenden alkylierenden Bestandteile der einzelnen Substanzen [31,57].

Die DNA-Alkylierung bedingt multiple Veränderungen, so z.B. die Vernetzung von DNA-Strängen (das sog. Cross-Linking), abnorme Basenpaarungen, die Spaltung von DNA-Ketten etc., was zu einer Beeinträchtigung der Nukleinsäure-Reduplikation und somit der Zellteilung führt [57].

Die zytotoxische Wirkung der Alkylantien ist zellzyklusphasen-unspezifisch; aufgrund ihrer allgemeinen Reaktionsfähigkeit gegenüber vielen Zellbestandteilen kommt es zur unspezifischen Schädigung vieler Zellfunktionen und letztendlich zur Zytolyse [29,30,57].

Des weiteren läßt sich eine höhere Toxizität gegenüber stark proliferierenden Zellen, somit auch Tumorzellen, im Vergleich zu normalen Zellen feststellen, wobei es innerhalb der Substanzgruppe durchaus Unterschiede bezüglich der Selektivität gibt [29,31].

Der Grad der Oxigenierung der Tumorzellen hat keinen Einfluß auf die Effektivität dieser Substanzen, wohingegen andere Zytostatika eine deutlich bessere Wirkung auf normooxygenierte Zellen zeigen [29].

Aufgrund der geringen Molekülgröße der Alkylantien ist eine gute Verteilung des Chemotherapeutikums innerhalb solider Tumoren gewährleistet, was eine mögliche Erklärung der Tatsache darstellt, daß Alkylantien sowohl in Monolayern als auch in dreidimensionalen Tumorformationen annähernd die gleiche Effektivität erzielen [29,72].

Eine allen Alkylantien inhärente Nebenwirkung, die wesentlich zur Dosislimitierung beiträgt, ist die Myelosuppression [32,76]. Durch einen Blutstammzellsupport mit Retransfusion von peripheren Blutstammzellen (PBSCT) ist hier eine erhebliche Dosissteigerung (etwa um den Faktor 5 gegenüber der konventionellen Therapie), wie sie für eine Hochdosis-Chemotherapie erforderlich ist, unter Umgehung dieser immanenten Nebenwirkung möglich [32,74,76].

Doch auch andere Organsysteme werden unter der Therapie mit Alkylantien in nicht unerheblichem Ausmaß in Mitleidenschaft gezogen, so dass eine Dosisreduktion erforderlich werden kann.

Wesentliche weitere unerwünschte Wirkungen des Melphalans, des Bendamustins und des Treosulfans sind auf den Gastrointestinaltrakt gerichtet. Cyclophosphamid weist in der Hochdosistherapie eine relevante Kardio-, Nephro- und Neurotoxizität auf. Die ebenfalls nicht selten auftretende hämorrhagische Zystitis lässt sich durch Hyperhydratation und kontinuierliche Blasenspülungen beherrschen. Cisplatin führt zu gastrointestinalen, renalen und neurologischen Nebenwirkungen und hat in Kombination mit anderen Alkylantien eine exzessive hepatische Toxizität [41,51,62,74,76].

1.2.3. Resistenzen

Die Entstehung von Resistenzen gegenüber Alkylantien ist in Abhängigkeit von der jeweiligen Substanz auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen, unter anderem auf:

1. Verlust der Transportfähigkeit des Zytostatikums durch die Zellmembran (z.B. Melphalan)
2. Konjugation und Inaktivierung im Zytoplasma durch das Glutathion / Glutathion-S-Transferase-System (BCNU)
3. Anstieg der Aldehyd-Dehydrogenase-Aktivität (Cyclophosphamid)
4. Gesteigerte Reparaturtätigkeit bei Alkylantien-induzierten DNA-Defekten.

Aufgrund dieser unterschiedlichen Resistenzmechanismen kommt es nur selten zu einer Ausbildung von Kreuzresistenzen zwischen Alkylantien [29,30,31].

Die Entwicklung Alkylantien-resistenter Zelllinien gestaltet sich im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika schwieriger, da Resistenzraten von mehr als dem zehnfachen gegenüber der Originalzelllinie in der Regel nicht zu erreichen sind. Eine darüber hinaus gehende Steigerung der Dosis führt zu keiner weiteren Steigerung der Resistenzrate, sondern zum Absterben der Zellen. Konkret bedeutet das, eine 10 bis 12-fache Dosissteigerung des eingesetzten alkylierenden Wirkstoffs wird durchaus Effekte auf solche Tumorzellen erzielen, die gegenüber der Standarddosis des selben Medikamentes refraktär sind. So führte z.B. eine 12-fache Dosissteigerung von Melphalan zu einer zytotoxischen Wirkung bei Patienten, die gegenüber der Standarddosis resistent waren [30].

Dieses relativ niedrige Resistenzniveau ist ein wesentlicher Faktor bei der Durchführung von Hochdosistherapien mit Alkylantien [27,30,81].

Ein weiterer Punkt ist das Fehlen eines „Ceiling-Effektes“ bei der Applikation hoher Alkylantien-Dosen; über einen weiten Dosisbereich zeigen Alkylantien eine log-lineare Wirkungsbeziehung [29,30,31].

1.2.4. Kombinationstherapie

Durch die Einführung der standardisierten Dosis, angegeben in mg / m² / Woche als Maßeinheit für die Dosisintensität, durch Hryniuk und Bush im Jahr 1984 zeigte sich nach Angleichung bereits vorliegender Studien an diese Maßeinheit, dass die Intensität der Dosis sowohl mit der Ansprechrate der jeweiligen Zytostatika (in diesem Fall der Medikamenten-Kombinationen CMF und CAF) als auch mit der Länge der medianen Überlebenszeit korreliert [35].

Nachdem es Bonadonna und Valagussa bereits 1981 in einer retrospektiven Studie gelungen war, nachzuweisen, dass die Höhe der kumulativen Dosis einer Medikamenten-Kombination mit der Länge des tumorfreien Überlebens der behandelten Patienten korreliert [13] und auch Frei ein Jahr zuvor eine logarithmische Tumorzell-Reduktion bei linearem Dosisanstieg des Chemotherapeutikums *in vitro* nachweisen konnte [28] war die Basis für Hochdosis-Therapien geschaffen.

Die zunächst durchgeführten Monotherapien zeigten selbst bei Gabe der Maximaldosen keine ausreichende kurative bzw. keine mit Wirkstoffkombinationen zu erreichende, vergleichbare Wirkung. Aus diesem Grund ging man zur Durchführung von Kombinations-Chemotherapien über [72]. Außerdem erfordert der Einsatz eines einzelnen Zytostatikums im Rahmen der Hochdosis-Therapie bei kurativer Intention bisweilen Dosissteigerungen um den Faktor 16, bei der Kombination von drei verschiedenen Medikamenten kann diese Steigerungsrate auf den Faktor 5 für jedes einzelne Zytostatikum gesenkt werden [32,74].

Bei der Auswahl zu kombinierender Wirkstoffe sollten folgende Bioeigenschaften als Auswahlkriterien berücksichtigt werden [31,56]:

1. Geringe Organtoxizität (d.h. nicht-hämatologische Toxizität).
2. Hohe Toxizität gegenüber Tumorzellen.
3. Fehlende Ausbildung von Kreuzresistenzen zwischen den in Kombination verwendeten Wirkstoffen.

1.2.5. Hochdosistherapie

Insbesondere beim Mammakarzinom legte die Auswertung retrospektiver Datenanalysen den Schluß nahe, dass mit dem Einsatz einer Hochdosis-Chemotherapie deutlich längere Überlebenszeiten und wesentlich bessere Prognosen zu erzielen sind als mit der konventionellen Dosierung eines Zytostatikums. Um in einer Hochdosis-Therapie sinnvoll eingesetzt werden zu können, muß das jeweilige Chemotherapeutikum gewisse Anforderungen erfüllen; es muß

1. in konventioneller Dosis wirksam sein
2. auch in hohen Dosen kontinuierlich steile Dose/Response-Kurven liefern
3. weder alleine noch in Kombination durch andere Nebenwirkungen als durch die Myelotoxizität dosislimitiert sein [74].

Die relativ gute Beherrschbarkeit der allen Alkylantien gemeinsamen Hauptnebenwirkung, der Myelosuppression, mit PBSCT, das niedrige Resistenzniveau und die aufgrund der Heterogenität der Substanzgruppe weitgehend fehlende Kreuzresistenz, sowie die auch bei Erreichen hoher Dosen unverändert logarithmisch ansteigenden Dosis-Wirkungs-Verläufe prädestinieren diese Substanzen für die Einbindung in Hochdosis-Kombinationstherapien.

1.3. Ziel der Arbeit

Aufgrund des unverändert bestehenden Bedarfs in der Entwicklung effektiver Therapieschemata zur Behandlung des Mammakarzinoms sollten die möglichen Interaktionen verschiedener Alkylantien-Kombinationen in vitro an einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie charakterisiert werden. Die Ergebnisse dieser Interaktionsanalysen können dann bei der Auswahl von Kombinationschemotherapie-Komponenten Berücksichtigung finden.

2. Materialien und Methodik

2.1. Materialien

2.1.1. Zellkulturen

Die Versuche wurden an einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie (MDA-MB 231) durchgeführt. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgte 1974 aus einem Tumor, der bei einer 51-jährigen, weißen Patientin aufgetreten war. Die chemotherapeutische Behandlung dieser Patientin wurde mit 5-FU, Prednison, Cytosan, Adriamycin und Methotrexat durchgeführt. Morphologisch handelt es sich bei diesen Tumorzellen um ein niedrig-differenziertes, spindelzelliges, intraduktal wachsendes Adenokarzinom der Mamma, das Östrogenrezeptor-negativ ist [15].

Als Nährmedium zur Zellkultivierung wurde das L-15-Leibovitz Medium unter Zusatz von 5 ml Glucose 5 %, 6,4 ml NaHCO₃, 5 ml Glutamin, 5 ml Penicillin / Streptomycin, 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren und 50 ml fetalem Kälberserum pro 500 ml Medium verwendet.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei einer Temperatur von 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einem Heraeus-Inkubator.

Die Passagefrequenz dieser Zelllinie lag bei 1x wöchentlich mit einer Umsetzung von 1 zu 10.

Nach Ausbildung eines Monolayers mit einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellkulturen unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurden zunächst die noch am Boden der Kulturflaschen anhaftenden Zellen mit PBS - Puffer gewaschen und anschließend mittels Zugabe von Trypsin (0,25 %) abgelöst. Es folgte die Resuspension der Zellen in L-15 Medium und die Umsetzung in neue Kulturflaschen. Die zur Zellpassage verwendeten Reagenzien lagen bei einer Temperatur von 37° C vor.

2.1.2. Zytostatika

Die Zytotoxizitäts- und Interaktionsanalysen wurden mit folgenden, zur Gruppe der Alkylantien gehörenden Chemotherapeutika durchgeführt:

1. Melphalan
2. Bendamustin
3. Cisplatin
4. Cyclophosphamid
5. Treosulfan

Die in den Versuchen verwendeten Zytostatika-Verdünnungen wurden für jeden Ansatz aus der Stammlösung unter Verdünnung mit L-15 Medium neu hergestellt.

Als Grundlage der in den Interaktionsanalysen eingesetzten Konzentrationen dienten die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Zytotoxizitätsassays.

1. Melphalan

Molgewicht: 305,0 mg / ml

Stammlösung: Konzentration von 1 mg / ml.

Melphalan wurde in einer Stammlösung aus Ethanol 10 %, HCl 0,1 % und Ampuwa gelöst .

(100 ml Stammlösung \Rightarrow 10 ml Ethanol 100 % + 0,1 ml HCl 100 % + 89,9 ml Ampuwa)

Die Stammlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt.

Verdünnungen: Die verwendeten Verdünnungsreihen lagen sowohl bei den Zytotoxizitätsassays als auch bei den Interaktionsanalysen in einem Konzentrationsbereich von 0,33 - 333 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

2. Bendamustin

Molgewicht: 394,7 mg / ml

Stammlösung: Konzentration von 1 mg / ml.

Bendamustin wurde in Ampuwa gelöst, das bei Raumtemperatur vorlag.

Die Stammlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt.

Verdünnungen: Die verwendeten Verdünnungsreihen lagen sowohl bei den Zytotoxizitätsassays als auch bei den Interaktionsanalysen in einem Konzentrationsbereich von 1,00 - 1000 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

3. Cisplatin

Molgewicht: 300,0 mg / ml

Stammlösung: Cisplatin lag als fertige Lösung mit einer fixen Konzentration von 0,5 mg / ml vor (Aufbewahrung bei Raumtemperatur).

Verdünnungen: Die verwendeten Verdünnungsreihen lagen sowohl bei den Zytotoxizitätsassays als auch bei den Interaktionsanalysen in einem Konzentrationsbereich von 0,33 - 333 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

4. Cyclophosphamid (in aktivierter Form als Hydroperoxycyclophosphamid)

Molgewicht: 293,1 mg / ml

Stammlösung: Konzentration von 1 mg / ml.

Cyclophosphamid wurde in Ampuwa gelöst, das auf 37° C erwärmt worden war.

Die Stammlösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt.

Verdünnungen: Die verwendeten Verdünnungsreihen lagen sowohl bei den Zytotoxizitätsassays als auch bei den Interaktionsanalysen in einem Konzentrationsbereich von 0,33 - 333 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

5. Treosulfan

Molgewicht: 278,0 mg / ml

Stammlösung: Konzentration von 2,78 mg / ml.

Treosulfan wurde in 37° C warmem Aqua dest. und 0,5 N NaOH gelöst. (Lösen von 278 mg Treosulfan in 5 ml Aqua dest., das auf 37° C erwärmt worden war. Zusetzen von 2,66 ml 0,5 N NaOH, nach einer Wirkzeit von ca. 15 min ist ein pH-Wert von > 7,5 erreicht. Anschließendes Auffüllen der Lösung mit Aqua dest. auf 100 ml).

Die Stammlösung wurde bei - 20° C gelagert.

Verdünnungen: Die verwendeten Verdünnungsreihen lagen bei den Zytotoxizitätsassays in einem Konzentrationsbereich von 3,3 - 3333 µmol / l und für die Interaktionsanalysen in einem Bereich von 1,0 - 1000 µmol / l.

2.2. **Methodik**

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der einzelnen Zytostatika wurden mittels SRB (Sulforhodamin B)-Assay durchgeführt, für die Interaktionsuntersuchungen wurde die Isobologrammanalyse nach Berenbaum verwendet. Bei beiden Verfahren wurde eine festgelegte Zellzahl der Mammakarzinom-Zelllinie MB 231 mit einem oder mehreren Zytostatika beimpft und inkubiert.

2.2.1. **Bestimmung der Zellzahl**

Nach Herstellen einer Zell-Stammlösung durch Ablösen und Resuspendieren der Zellen in L-15 Medium erfolgte die Zellzahlbestimmung durch Anfärben mit Eosin und Auszählen in einer Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop.

Für die Durchführung der Zytotoxizitätsassays wurde die Stammlösung auf 2000 Zellen pro 100 µl verdünnt, für die Interaktionsanalysen wurde eine Zellzahl von 1500 Zellen pro 100 µl verwendet.

2.2.2. Zytotoxizitätsassays

Bei dem zur Zytotoxizitätsbestimmung angewandten Verfahren handelte es sich um den Sulforhodamin B-Assay (SRB-Assay). Sulforhodamin-B ist ein wasserlöslicher Farbstoff, der an die basischen Aminosäuren der zellulären Proteine bindet. So ermöglicht die colorimetrische Messung des gebundenen Farbstoffes eine Einschätzung des Gesamtproteingehaltes pro well, der wiederum mit der Zellzahl im well korreliert. Der Vergleich der Proteingehalte behandelter zu unbehandelten wells lässt eine Aussage über die zytostatische Wirkung des eingesetzten Medikamentes zu.

Nach Ausfällung und Fixierung der zellulären Proteine durch Trichloressigsäure werden diese mit dem rosafarbenen Farbstoff Sulforhodamin B angefärbt, mittels TRIS-Puffer extrahiert und die Absorption photometrisch gemessen.

Zur Durchführung der Tests werden 96 Loch-Microtiterplatten verwendet, die mit je 100 µl pro well (Bezeichnung der Vertiefungen der Platte) einer Zellsuspension beschickt werden. Die hierbei eingesetzte Zellzahl lag bei 2000 Zellen pro 100 µl.

Konkreter Versuchsablauf:



1. Ablösen des passagefähigen Zell-Monolayers vom Boden der Kulturflasche mittels Trypsin nach vorherigem Waschen mit PBS-Puffer (s. Zellpassage bei Zellkulturen). Resuspension der Zellen in L-15-Medium und Ermittlung der Zellzahl in der Stammlösung durch Auszählen in einer Bürker-Zählkammer (s. Bestimmung der Zellzahl). Anschließend Verdünnung der Stammlösung auf 2000 Zellen pro 100 µl und Beimpfen der Microtiterplatten, d.h. pro well werden 2000 Zellen der Linie MB 231 eingesetzt.

2. Nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank (37 °C) erfolgt die Applikation der Zytostatikaverdünnungen, wobei jeweils eine Reihe mit 8 wells für eine Verdünnung gewählt wird. Auslassen von 3 Reihen mit je 8 wells als Kontrolle zur Dokumentation des unbeeinflussten Zellwachstums.
3. Zwei Stunden - Inkubation im Brutschrank (37 °C), anschließendes Absaugen des Überstandes und Zugabe von 200 µl L-15-Medium pro well. Erneute Inkubation der Zellen bis zum Ablauf von 120 Stunden nach Zelleinsaat.
4. Zugabe von 50 µl 50%-iger Trichloressigsäure pro well und Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C für längstens 2 Stunden. Danach Waschen der Platten mit PBS-Puffer und Lufttrocknung. Applikation von 50 µl SRB-Farbstoff pro well, nach einer Einwirkzeit von mindestens 15 Minuten, um eine 100%-ige Anfärbung der Proteine zu erreichen, erneutes Waschen der Platten mit 1%-iger Essigsäure. Aufpipettieren von 150 µl 10 mM Tris-Puffer (100 mmol) pro well und 5-minütiges Schütteln. Abschließende Messung der Absorption im Photometer bei 570 nm.

2.2.3. Interaktionsanalysen

Auf der Grundlage der Zytotoxizitätsassays zur Bestimmung der IC₅₀-Werte der einzelnen Zytostatika wurden dann die Wechselwirkungen der Chemotherapeutika untereinander mit Hilfe der Isobologrammanalyse nach Berenbaum untersucht. Im Einzelnen handelt es sich um folgende Zytostatikakombinationen:

1. Cisplatin \Leftrightarrow Bendamustin
2. Cisplatin \Leftrightarrow Treosulfan
3. Cisplatin \Leftrightarrow Cyclophosphamid
4. Cyclophosphamid \Leftrightarrow Bendamustin
5. Cyclophosphamid \Leftrightarrow Treosulfan
6. Cyclophosphamid \Leftrightarrow Melphalan

Ausgehend von der jeweiligen IC₅₀ als Bezugskonzentration wurden hiervon 25%, 50% und 75% des Zytostatikums A mit einer Verdünnungsreihe des Zytostatikums B (s. Zytostatikaverdünnungen) kombiniert.

Daraus ergaben sich konkret die unten aufgeführten Kombinationen:

Dosis	Zytostatikum A	Dosis	Zytostatikum B
48,00 µmol/l (25%)	Cisplatin	1 - 1000 µmol/l	Bendamustin
96,00 µmol/l (50%)			
144,00 µmol/l (75%)			
48,00 µmol/l (25%)	Cisplatin	1 - 1000 µmol/l	Treosulfan
96,00 µmol/l (50%)			
144,00 µmol/l (75%)			
48,00 µmol/l (25%)	Cisplatin	0,33 - 333 µmol/l	Cyclophosphamid
96,00 µmol/l (50%)			
144,00 µmol/l (75%)			
17,00 µmol/l (25%)	Cyclophosphamid	1 - 1000 µmol/l	Bendamustin
34,00 µmol/l (50%)			
51,00 µmol/l (75%)			
17,00 µmol/l (25%)	Cyclophosphamid	1 - 1000 µmol/l	Treosulfan
34,00 µmol/l (50%)			
51,00 µmol/l (75%)			
17,00 µmol/l (25%)	Cyclophosphamid	0,33 - 333 µmol/l	Melphalan
34,00 µmol/l (50%)			
51,00 µmol/l (75%)			
17,00 µmol/l (25%)	Cyclophosphamid	0,33 - 333 µmol/l	Cisplatin
34,00 µmol/l (50%)			
51,00 µmol/l (75%)			
159,25 µmol/l (25%)	Bendamustin	0,33 - 333 µmol/l	Cisplatin
318,50 µmol/l (50%)			
477,75 µmol/l (75%)			
159,25 µmol/l (25%)	Bendamustin	0,33 - 333 µmol/l	Cyclophosphamid
318,50 µmol/l (50%)			
477,75 µmol/l (75%)			
511,75 µmol/l (25%)	Treosulfan	0,33 - 333 µmol/l	Cisplatin
1023,50 µmol/l (50%)			
1535,25 µmol/l (75%)			
511,75 µmol/l (25%)	Treosulfan	0,33 - 333 µmol/l	Cyclophosphamid
1023,50 µmol/l (50%)			
1535,25 µmol/l (75%)			
51,00 µmol/l (25%)	Melphalan	0,33 - 333 µmol/l	Cyclophosphamid
102,00 µmol/l (50%)			
153,00 µmol/l (75%)			

Das Testprinzip der Isobologrammanalyse basiert auf folgender mathematischer Formel:

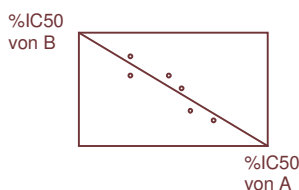
$$\text{Interaktionsindex } I = \frac{d_T}{D_T} + \frac{d_K}{D_K}$$

wobei d_T der eingesetzten Dosis des Zytostatikums A in $\mu\text{mol} / \text{l}$, D_T der IC50 des Zytostatikums A in $\mu\text{mol} / \text{l}$ entspricht. Die entsprechende Kombinationsdosis des Zytostatikums B in $\mu\text{mol} / \text{l}$ wird durch d_K und die IC50 des Zytostatikums B in $\mu\text{mol} / \text{l}$ durch D_K symbolisiert [6,7].

Die Art der Zytostatikainteraktion wird an Hand des Zahlenwertes des Interaktionsindex I bestimmt:

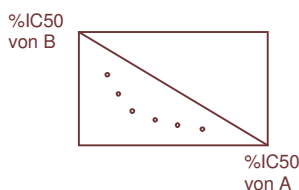
- $I = 1 \Rightarrow$ die Kombinationspartner haben eine additive Wirkung
- $I < 1 \Rightarrow$ zwischen den Kombinationspartnern besteht eine synergistische Wirkungsweise
- $I > 1 \Rightarrow$ die Kombinationspartner antagonisieren sich in ihrer Wirkung.

Die grafische Auswertung der Ergebnisse stellt sich folgendermaßen dar:



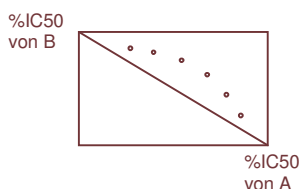
Parallel zur Verbindungslinie der IC50-Werte verlaufende Kurve:

Additive Wirkung



Nach rechts konkav verlaufende Kurve unterhalb der Verbindungslinie:

Synergismus



Nach links konkav verlaufende Kurve oberhalb der Verbindungslinie:

Antagonismus

Hierbei ist die Lage der Konkavität wesentlicher für die Bestimmung des Interaktionscharakters als die definitive Lage der Isobologrammpunkte in Relation zur IC50-Verbindungsline [6,7].

Der Versuchsaufbau war im wesentlichen identisch mit dem des SRB-Assays:



1. Ablösen des passagefähigen Zell-Monolayers vom Boden der Kulturflasche mittels Trypsin nach vorherigem Waschen mit PBS-Puffer (s. Zellpassage bei Zellkulturen). Resuspension der Zellen in L-15-Medium und Ermittlung der Zellzahl in der Stammlösung durch Auszählen in einer Bürker-Zählkammer (s. Bestimmung der Zellzahl). Anschließende Verdünnung der Stammlösung auf 1500 Zellen pro 100 µl und Beimpfen der Microtiterplatten, d.h. pro well werden 1500 Zellen der Linie MB 231 eingesetzt.
2. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank (37 °C) erfolgt die simultane Applikation von jeweils 50µl der beiden ausgewählten Zytostatika-Lösungen, wobei eine Reihe mit 8 wells unbehandelt blieb und 2 Reihen mit je 8 wells ausschließlich mit 25%, 50% oder 75% des Zytostatikums A beimpft wurden.
3. Zwei Stunden-Inkubation im Brutschrank (37 °C), anschließendes Absaugen des Überstandes und Zugabe von 200 µl L-15-Medium pro well. Erneute Inkubation der Zellen bis zum Ablauf von 120 Stunden nach Zelleinsaat.
4. Zugabe von 50 µl 50%-iger Trichloressigsäure pro well und Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C für längstens 2 Stunden. Danach Waschen der Platten mit PBS-Puffer und Lufttrocknung. Applikation von 50 µl SRB-Farbstoff pro well, nach einer Einwirkzeit von mindestens 15 Minuten, um eine 100%-ige Anfärbung der Proteine zu erreichen, erneutes Waschen der Platten mit 1%-iger Essigsäure. Aufpipettieren von 150 µl 10 mM Tris-Puffer (100 mmol) pro well und 5-minütiges Schütteln. Abschließende Messung der Absorbtion im Photometer bei 570 nm.

2.3. Statistik

2.3.1. Auswertung der Zytotoxizitätsassays

Zunächst wurde für jeden Versuchsansatz der Mittelwert aus den 24 Absorbtionswerten der unbehandelten Kontrollgruppe errechnet. Dieser Wert wurde einem Zellwachstum von 100% gleichgesetzt. Die Absorbtionswerte der einzelnen Zytostatika-Verdünnungen wurden ebenfalls gemittelt und in Relation zur Wachstumskontrolle gesetzt. Die Werte für eine 50%-ige Wachstumshemmung wurden, sofern sie sich nicht aus den ermittelten Werten direkt ergaben, interpoliert. Abschließend wurden die Ergebnisse aus den insgesamt 14 einzelnen Versuchsansätzen zu einem definitiven Mittelwert zusammengefasst und dessen Standardabweichung berechnet.

2.3.2. Auswertung der Isobologramme

Bei der Auswertung der Isobologramme wurde ebenfalls zunächst der Mittelwert der Wachstumskontrolle errechnet, dann wurden die Ergebnisse der einzelnen Zytostatika-Kombinationen gemittelt und der Wert für die 50%-ige Wachstumshemmung abgelesen bzw. interpoliert.

Abschließend wurde auch hier das Mittel der IC50-Werte des Zytostatikums B aus den einzelnen Versuchen der jeweiligen Zytostatika-Kombinationen genommen und in die Grafik eingetragen.

Die Berechnung der einzelnen Werte erfolgte anhand der nachstehenden Formeln:

Mittelwert:
$$m_w = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n w_i$$

Standardabweichung:
$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (w_i - Mw)^2}$$

Interpolation:
$$IC50 = \frac{K_H - (50 - Z_L) \cdot (K_H - K_L)}{(Z_H - Z_L)}$$

mit: K_H = Zytostatikakonzentration > IC50

K_L = Zytostatikakonzentration < IC50

Z_H = Zellwachstum in % > 50%

Z_L = Zellwachstum in % < 50%

2.4. Materialnachweis

2.4.1. Chemikalien

Alkeran[®] (Melphalan), Glaxo;

Eosin-Tyrode Lösung 0,25%, Apotheke des Universitätsklinikums Essen;

Essigsäure mind. 99,8%, Riedel de Haën, 2789 ;

Fetales Kälberserum 10%, Seromed, S 0115;

Glukose 5%, Braun Melsungen AG, B05CX01;

Glutamin Trockensubstanz 20 mM, Seromed, K 0281;

Hydroperoxycyclophosphamid, Asta Pharma;

Medium L-15 Leibowitz, Boehringer, L 4386;

Methanol, Riedel de Haën, Un/No.1213;

Natriumhydrogenkarbonat[®] 8,4%, Braun Melsungen AG, 278525/0;

Natriumhydroxid 1 N, Merck;

Nicht Essentielle Aminosäuren, Seromed, K 0293;

Ovastat[®] (Treosulfan), medac;

PBS Puffer ohne Kalzium- und Magnesiumzusätze, pH-Wert 7,2, Apotheke des Universitätsklinikums Essen;

Penicillin/Streptomycin Trockensubstanz, Seromed, A 2210;

Platinex[®] (Cisplatin), Bristol;

Ribomustin[®] (Bendamustin), ribosepharm;

Sulforhodamin B, Sigma, S-9012;

Trichloressigsäure Trockensubstanz, Sigma, T-4885;

Tris (hydroxymethyl) aminomethan Trockensubstanz (TRIS Puffer), Merck, 8387;

Trypsin, Seromed, L2123.

Sämtliche Trockensubstanzen wurden in Ampuwa[®] (bidestilliertem Wasser) gelöst.

2.4.2. Laborgeräte

Einwegpipetten (steril) 5 ml, Falcon, 7532;

Heraeus Inkubator; Heraeus Lamin Air Flow System, Seriennummer 2448;

Kulturflaschen, Costar, 3375;

Laborröhrchen 50ml, Greiner, 210261;

Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und Flachboden, Falcon, 3072;

Multipipette mit 25 µl, 50 µl, und 100 µl Aufsätzen, Eppendorf, 4780;

Phasenkontrastmikroskop Wilovert;

Photometer für Mikrotiterplatten MR 7000, Dynatech;

Platwasher Platewash, LKB Wallac, 1296-024;

Rüttler Plateshake, LKB Wallac, 1296-001.

3. Ergebnisse

3.1. Zytotoxizitätsassays

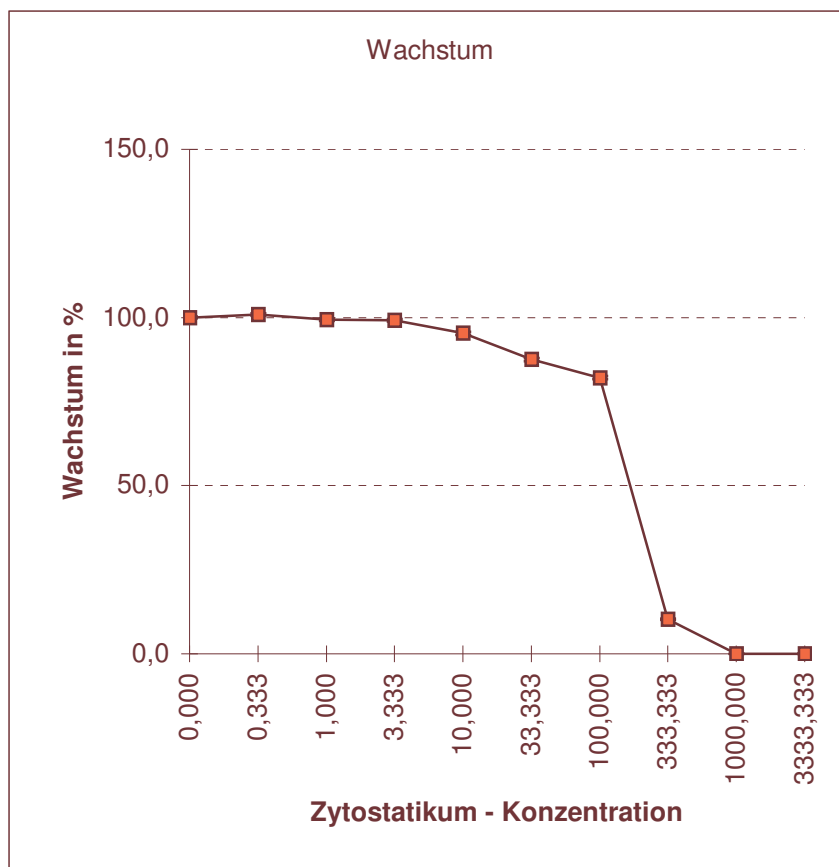
Für die Zytotoxizitätsbestimmungen wurden die Zellen der Linie MB 231 für jeweils 2 Stunden mit den Einzelsubstanzen inkubiert.

Die Ergebnisse lassen sich aus den graphischen Darstellungen ablesen, wurden jedoch zur exakten Bestimmung noch mathematisch interpoliert.

1. Melphalan

Die IC₅₀ für Melphalan liegt bei einem Wert von 204 µmol / l.

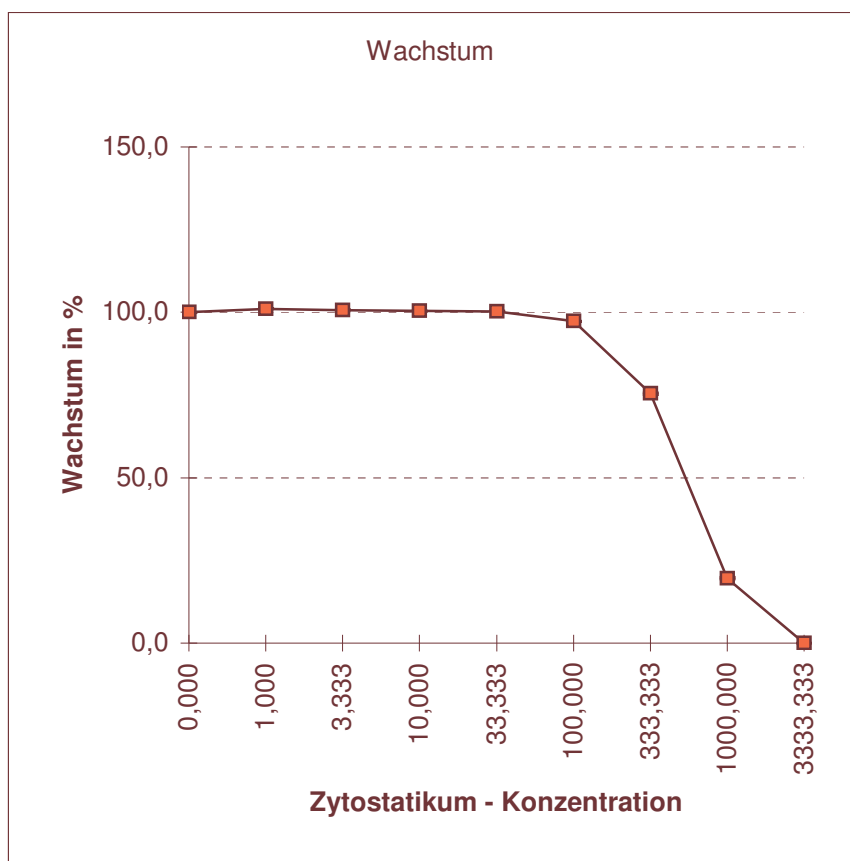
	W-K	Zytostatika-Konzentrationen in µmol / l						
		0,333	1,000	3,333	10,000	33,333	100,000	333,333
Mittelwert	2,419	2,441	2,403	2,398	2,306	2,118	1,986	0,245
Standardabw.	0,330	0,295	0,355	0,362	0,476	0,484	0,480	0,142
% Wachstum	100,0	100,9	99,3	99,1	95,3	87,5	82,1	10,1



2. Bendamustin

Der IC₅₀-Wert für Bendamustin beträgt 637 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

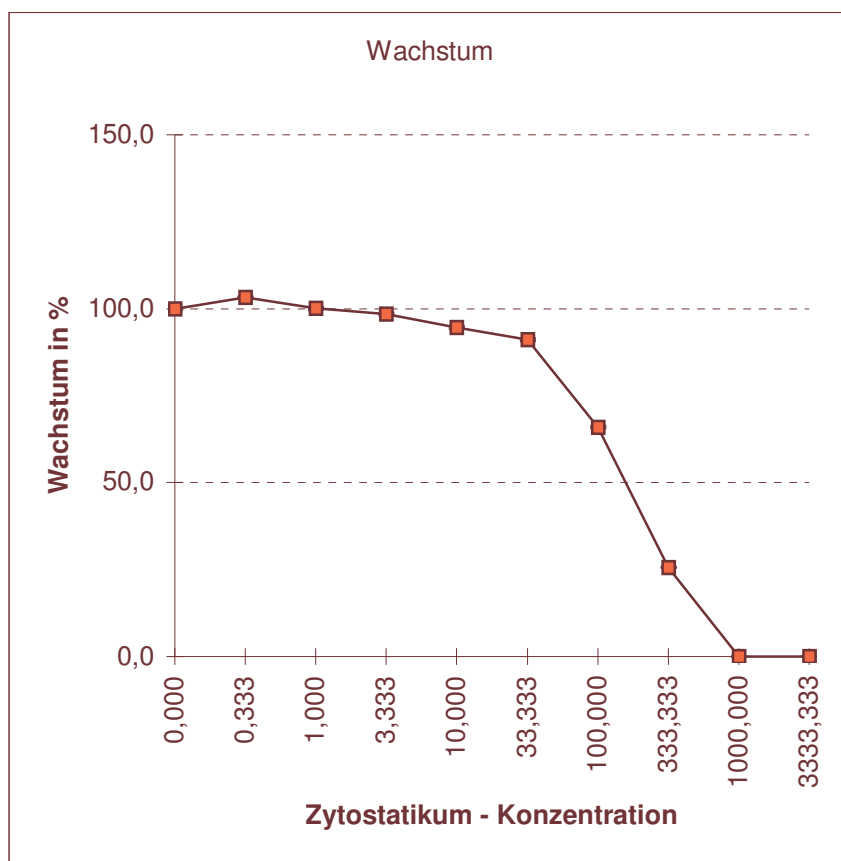
	W-K	Zytostatika-Konzentrationen in $\mu\text{mol} / \text{l}$						
		1,000	3,333	10,000	33,333	100,000	333,333	1000,00
Mittelwert	2,598	2,625	2,615	2,607	2,606	2,527	1,959	0,509
Standardabw.	0,134	0,114	0,121	0,111	0,131	0,149	0,323	0,304
% Wachstum	100,0	101,1	100,7	100,4	100,3	97,3	75,4	19,6



3. Cisplatin

Cisplatin hat eine IC50 von 192 µmol / l.

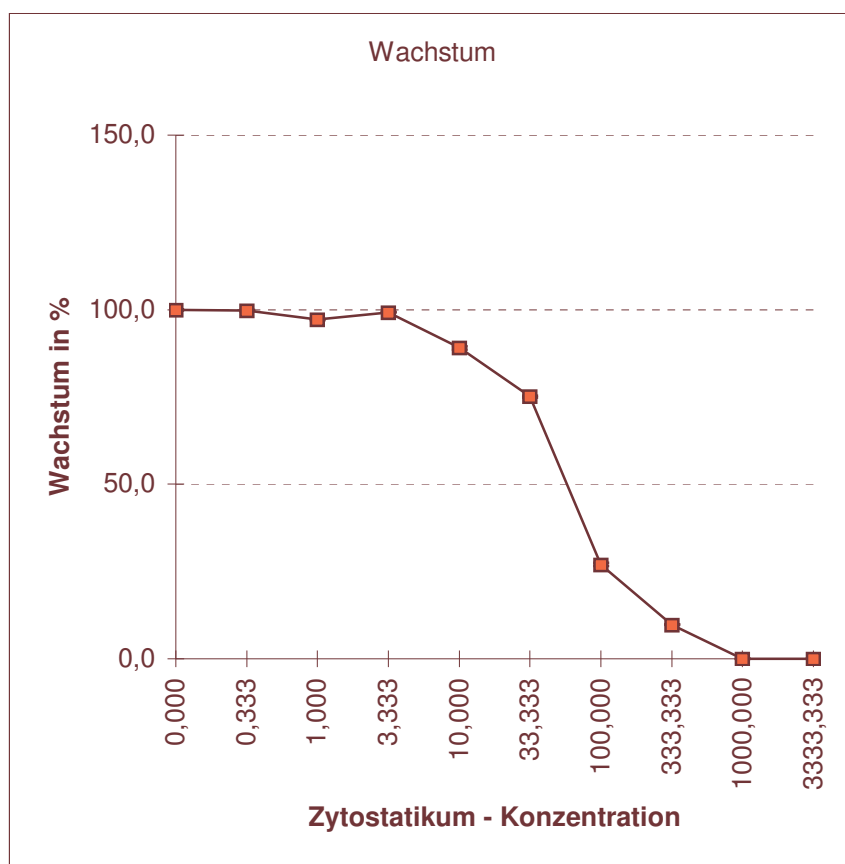
	W-K	Zytostatika-Konzentrationen in µmol / l							
		0,333	1,000	3,333	10,000	33,333	100,000	333,333	
Mittelwert	2,204	2,275	2,207	2,170	2,085	2,007	1,453	0,565	
Standardabw.	0,326	0,243	0,297	0,402	0,379	0,357	0,282	0,078	
% Wachstum	100,0	103,2	100,1	98,5	94,6	91,1	65,9	25,6	



4. Cyclophosphamid

Die IC₅₀ für Cyclophosphamid liegt bei 68 µmol / l.

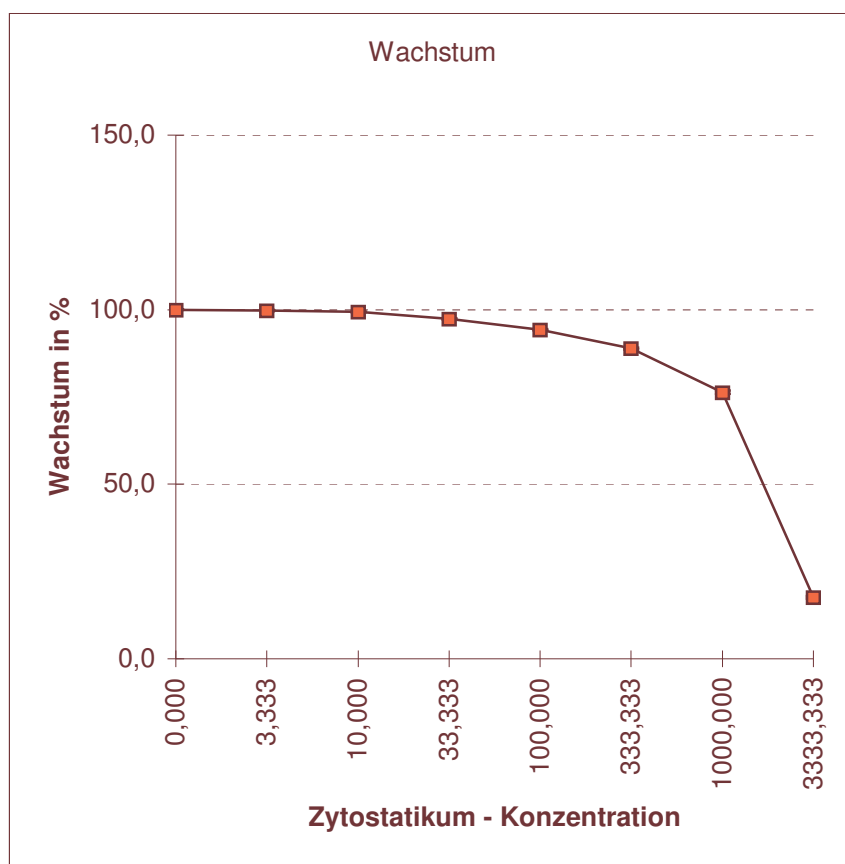
	W-K	Zytostatika-Konzentrationen in µmol / l							
		0,333	1,000	3,333	10,000	33,333	100,000	333,333	
Mittelwert	2,064	2,060	2,006	2,049	1,838	1,550	0,557	0,202	
Standardabw.	0,168	0,178	0,230	0,145	0,404	0,270	0,432	0,142	
% Wachstum	100,0	99,8	97,2	99,3	89,0	75,1	27,0	9,8	



5. Treosulfan

Treosulfan erreicht die IC₅₀ bei einer Konzentration von 2047 $\mu\text{mol} / \text{l}$.

	W-K	Zytostatika-Konzentrationen in $\mu\text{mol} / \text{l}$						
		3,333	10,000	33,333	100,000	333,333	1000,00	3333,33
Mittelwert	2,618	2,614	2,600	2,550	2,468	2,327	2,000	0,461
Standardabw.	0,151	0,188	0,197	0,209	0,206	0,305	0,484	0,419
% Wachstum	100,0	99,8	99,3	97,4	94,3	88,9	76,4	17,6



3.1.1. Tabelle der IC50-Werte

Auf der Basis der nachfolgend dargestellten IC50-Konzentrationen wurden die im Anschluß durchgeführten Isobologrammanalysen aufgebaut.

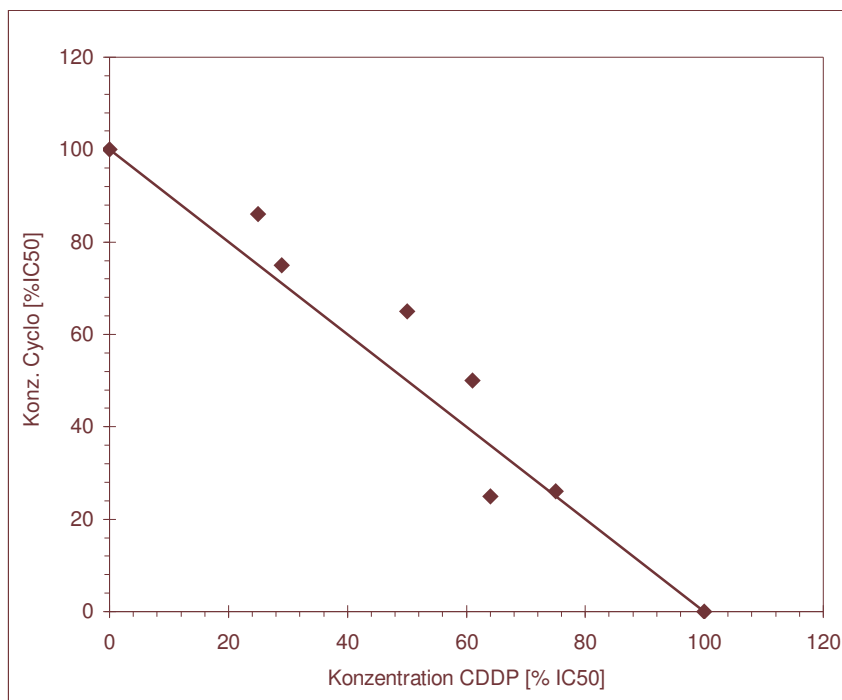
Zytostatikum	IC50 in $\mu\text{mol} / \text{l}$
Melphalan	204
Bendamustin	637
Cisplatin	192
Cyclophosphamid	68
Treosulfan	2047

3.2. Interaktionsanalysen

Für die Untersuchung der Wechselwirkungen der Zytostatika untereinander wurden die Zellen für die Dauer von 2 Stunden mit der jeweiligen Medikamentenkombination, die simultan und in identischen Volumina appliziert wurde, inkubiert.

1. Cisplatin / Cyclophosphamid

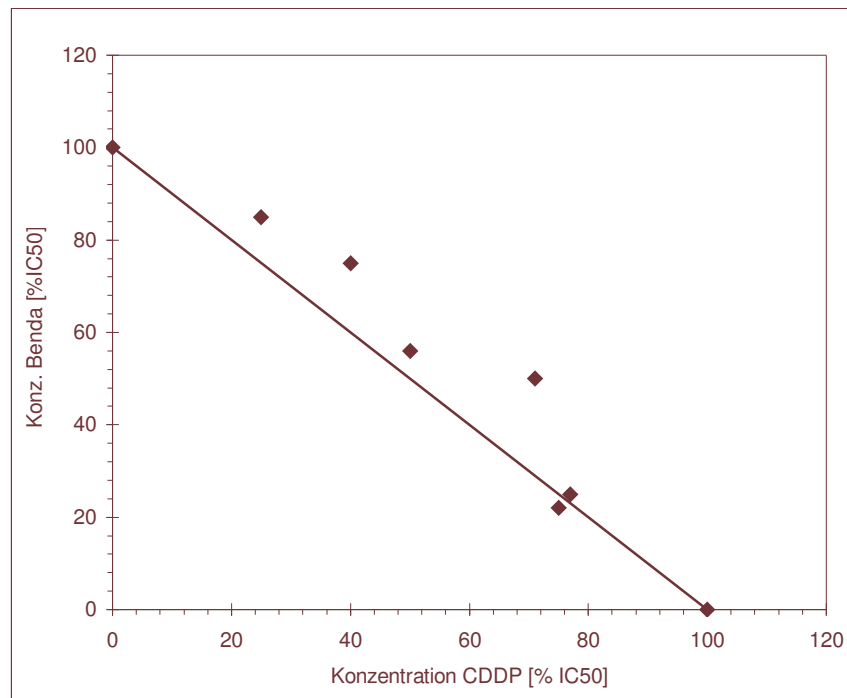
Konz.CDDP (%d.IC50)	25	50	75	64	61	29
Konz.Cyclo (%d.IC50)	86	65	26	25	50	75



Die in dieser Analyse ermittelten Messwertpunkte gruppieren sich parallel zur Verbindungslinie der IC 50-Werte; das bedeutet, dass die Kombination der Chemotherapeutika Cisplatin und Cyclophosphamid zu einer additiven Wirkung führt.

2. Cisplatin / Bendamustin

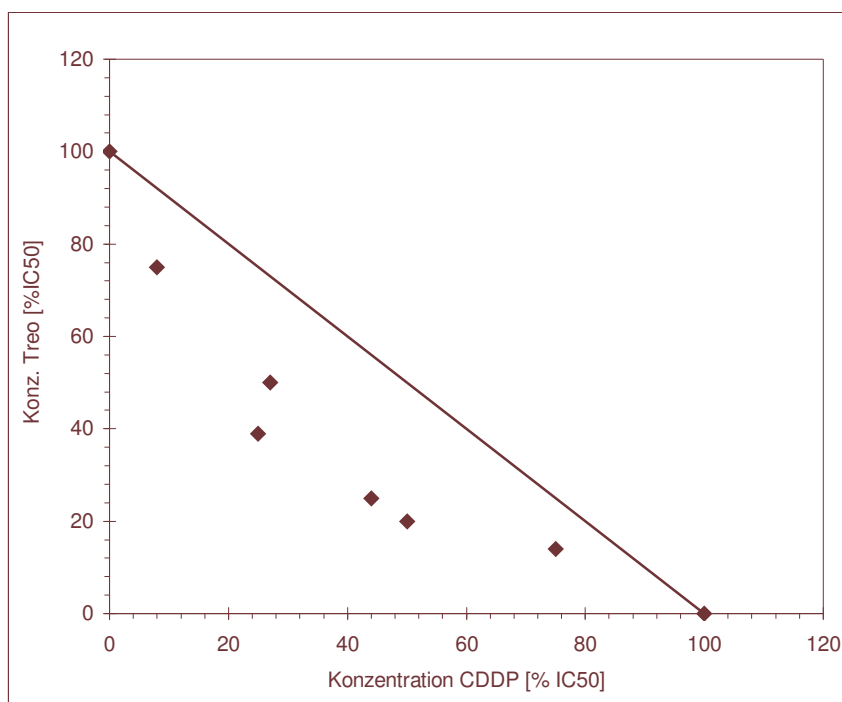
Konz.CDDP (%d.IC50)	25	50	75	77	71	40
Konz.Benda (%d.IC50)	85	56	22	25	50	75



Auch bei dieser Analyse liegen die Messwertpunkte parallel zur IC 50-Verbindungsline, womit die Kombination von Cisplatin und Bendamustin ebenfalls einen additiven Effekt erzielt.

3. Cisplatin / Treosulfan

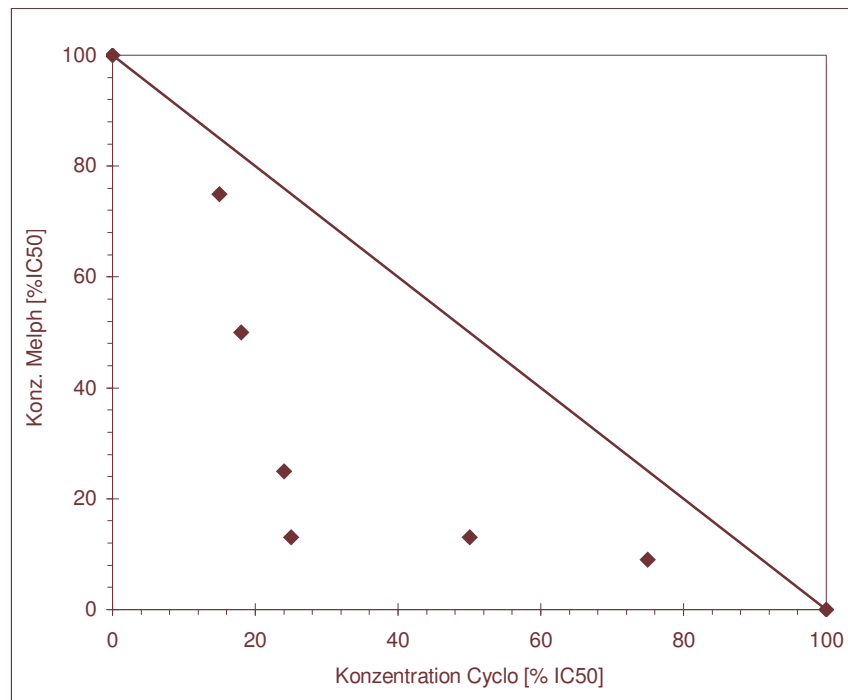
Konz.CDDP (%d.IC50)	25	50	75	44	27	8
Konz.Treo (%d.IC50)	39	20	14	25	50	75



In dieser Analyse bilden die Messwertpunkte eine nach rechts konkav verlaufende Kurve unterhalb der IC 50-Verbindungsline. Daraus ergibt sich für die Kombination von Cisplatin und Treosulfan eine synergistische Wirkungsweise.

4. Cyclophosphamid / Melphalan

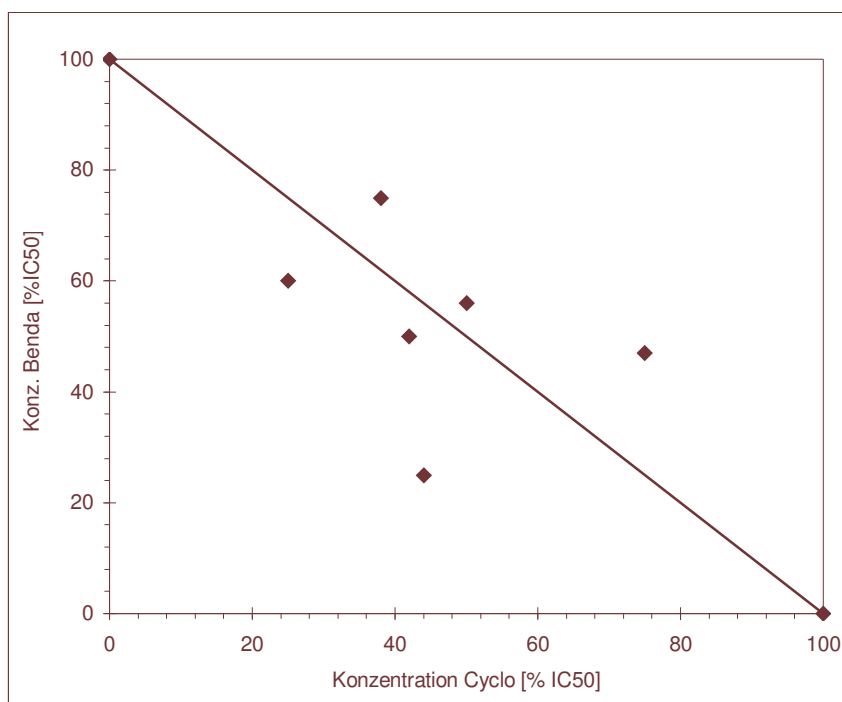
Konz.Cyclo (%d.IC50)	25	50	75	24	18	15
Konz.Melph (%d.IC50)	13	13	9	25	50	75



Bei dieser Analyse verläuft die Kurve der Messwertpunkte mit einer ausgeprägten, nach rechts gerichteten Konkavität unterhalb der IC 50-Verbindungsline. Hieraus lässt sich für die Kombination von Cyclophosphamid und Melphalan eine deutlich synergistische Wirkweise ableiten.

5. Cyclophosphamid / Bendamustin

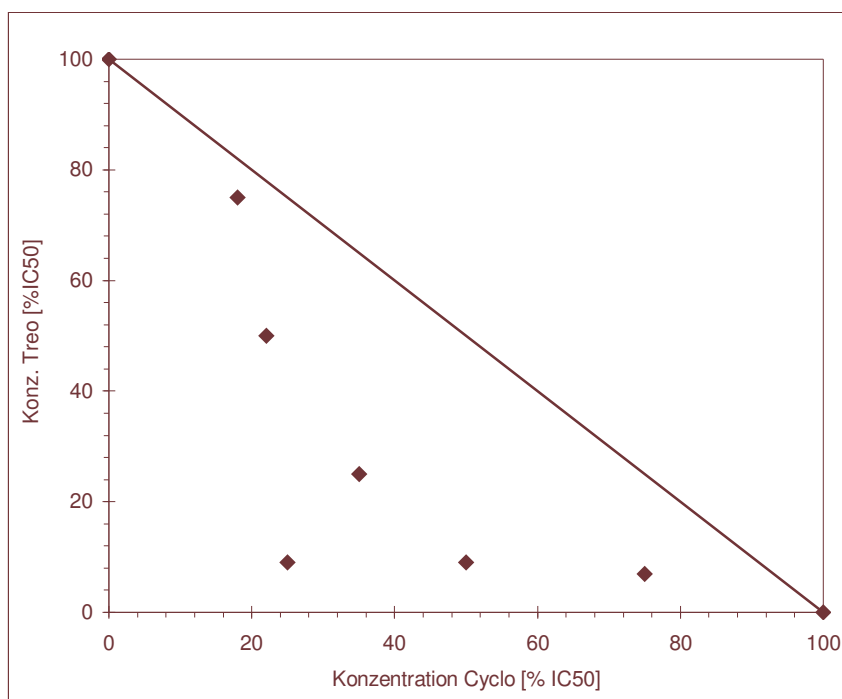
Konz.Cyclo (%d.IC50)	25	50	75	44	42	38
Konz.Benda (%d.IC50)	60	56	47	25	50	75



In dieser Analyse zeigt sich eine insgesamt parallel zur IC50-Verbindungsline verlaufende Anordnung der Messwertpunkte, die jedoch eine relativ breite Streuung aufweisen. Damit ist der Gesamteffekt der Kombination von Cyclophosphamid und Bendamustin ebenfalls additiv.

6. Cyclophosphamid / Treosulfan

Konz.Cyclo (%d.IC50)	25	50	75	35	22	18
Konz.Treo (%d.IC50)	9	9	7	25	50	75



Bei dieser Analyse zeigt sich wieder eine deutlich nach rechts konkave Kurve der Messwertpunkte, die wiederum unterhalb der IC 50-Verbindungsline gelegen ist. Auch mit der Kombination von Cyclophosphamid und Treosulfan lässt sich ein synergistischer Effekt erzielen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit den Kombinationen Cisplatin / Cyclophosphamid, Cisplatin / Bendamustin und Cyclophosphamid / Bendamustin additive Effekte erreicht werden können, wohingegen mit den Kombinationen Cisplatin / Treosulfan, Cyclophosphamid / Melphalan und Cyclophosphamid / Treosulfan ein Synergismus zu erzielen ist. Antagonistische Wirkungen ließen sich bei den gewählten Kombinationen nicht beobachten.

3.2.1. Tabelle der Interaktionen

Zytostatika-Kombination	Interaktion
Cisplatin / Cyclophosphamid	additiv
Cisplatin / Bendamustin	additiv
Cisplatin / Treosulfan	synergistisch
Cyclophosphamid / Melphalan	synergistisch
Cyclophosphamid / Bendamustin	additiv
Cyclophosphamid / Treosulfan	synergistisch

4. Diskussion

Etwa ein Viertel bis ein Drittel aller malignen Tumorerkrankungen bei Frauen entfallen auf das Mammakarzinom.

Die Inzidenz dieser Erkrankung liegt gegenwärtig bei 50–100 / 100.000 pro Jahr in den westlichen Industrieländern (50–70 / 100.000 pro Jahr in Europa und 90–100 / 100.000 pro Jahr in den USA) mit einer deutlich steigenden Tendenz. Die jährlichen Zuwachsraten liegen derzeit bei etwa 3% [42,78,95].

Der kurative Therapieansatz umfasst die operative Behandlung, sowie die post-operative Radiatio und optional die adjuvante Chemotherapie. Trotz ständiger Weiterentwicklung der adjuvanten Therapieregime versterben rund 50% aller Brustkrebspatientinnen an ihrer malignen Erkrankung, Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom versterben in über 90% der Fälle innerhalb von 5 Jahren nach der Diagnosestellung. [40,53,70].

In Anbetracht dieser unverändert negativen Entwicklungen der Karzinom-Statistik erscheint es dringend erforderlich, andere und effektivere Therapie-regime zu finden.

Eine Möglichkeit hierbei könnte der Einsatz neuer Zytostatika-Kombinationen in der Hochdosistherapie sein.

4.1. Materialien und Methodik

4.1.1. Zellkulturen

Bei der ausgewählten Zelllinie handelt es sich um ein niedrig-differenziertes, Hormonrezeptor-negatives, duktales Karzinom der Mamma, womit dieser Tumor die Kriterien für ein sogenanntes High-Risk-Karzinom erfüllt [15,95].

In Kultur erfolgt das Zellwachstum als Monolayer; mittels Wachstumskinetiken konnte ein exponentielles Zellwachstum nachgewiesen werden.

4.1.2. Zytostatika

Die in den Versuchen eingesetzten Zytostatika gehören alle der heterogenen Gruppe der Alkylantien an, wobei fast jede Subgruppierung durch mindestens einen Vertreter repräsentiert wird [19].

Daß insbesondere diese Substanzgruppe Eingang in die Therapie sowohl solider Tumoren als auch hämatologischer Neoplasien gefunden hat und regelhaft in (Hochdosis-) Kombinationstherapien zum Einsatz kommt, erklärt sich durch die dieser Gruppe inhärenten biochemischen Eigenschaften.

Hier sind zum einen die zellzyklusphasen-unspezifische Wirkweise und die Unabhängigkeit vom Oxygenierungsgrad der Tumorzellen, sowie die gute und gleichmäßige Verteilung der Alkylantien innerhalb der Tumore zu nennen, die zu der Breitspektrum-Antitumoraktivität dieser Substanzen beitragen [29,31,72].

Das relativ niedrige Resistenzniveau und das Fehlen eines „Ceiling-Effektes“ sind optimale Voraussetzungen insbesondere für den Einsatz in der Hochdosistherapie [29,30,31].

Schabel konnte zeigen, dass die Resistenz einer Tumorzellpopulation gegenüber einem Alkylanz nicht notwendigerweise zu einer Kreuzresistenz gegenüber anderen Alkylantien führt [72].

Die synergistische Wirkweise bestimmter Alkylantien-Kombinationen in vitro konnte von Teicher demonstriert werden [88]. Hierbei zeigte sich auch, dass der myelotoxische Effekt der gleichen Kombination nur subadditiv war. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte Schabel bei seinen Versuchen, in denen die Toxizität gegenüber normalen Zellen maximal additiv, meistens jedoch sogar subadditiv war [72]. Hierdurch wurde die Selektivität der Alkylantien für stark proliferierende (Tumor-) Zellen bei gleichzeitiger relativer Schonung gesunden Gewebes belegt.

Ein weiterer Aspekt in der Wirkungsweise von Alkylantien-Kombinationen ist die bei bestimmten Substanzen auftretende Kollateralsensitivität. Frei sah nach der Exposition von Tumorzellen auf Cyclophosphamid eine deutliche Reaktivitätssteigerung gegenüber weiteren, nachfolgend applizierten Alkylantien, bzw. bei Cyclophosphamid-resistenten Zellen bestand in fast 50% der Fälle diese Kollateralsensitivität ohne jedoch ein gleichzeitig erhöhtes Auftreten von Kreuzresistenzen [30].

Während es bei Zellen, die gegenüber Melphalan resistent sind, in ca. 60% zur Ausbildung von Kreuzresistenzen gegenüber anderen Alkylantien kommt, ist dieselbe Substanz bei gegenüber anderen Alkylantien resistenten Zellen hochwirksam. Ganz ähnliche Ergebnisse zeigen Kombinationen mit BCNU; hier liegt die Kreuzresistenzrate bei 38% [30]. Daraus lässt sich für Kombinationstherapien grundsätzlich ableiten, dass Cyclophosphamid aufgrund fehlender Kreuzresistenzen und der höchsten Kollateralsensitivitätsrate als Erstmedikation optimal geeignet ist, da die Applikation dieses Wirkstoffes die Tumorzellen gegenüber den nachfolgend eingesetzten Zytostatika sensibilisiert ohne jedoch zu einem vermehrten Auftreten von Resistenzentwicklungen zu führen. Im Gegensatz dazu bieten sich Melphalan und BCNU durch hohe Kollateralsensitivität als Zweit-Wirkstoff an. Als Erstmedikation führen diese Wirkstoffe zu hohen Kreuzresistenzraten; sie sind jedoch als Zweitmedikation hervorragend geeignet, da sie selbst bei sonst Alkylantien-resistenten Tumorzellen gute Effekte erzielen.

4.1.3. Zytotoxizitätsassays

Das bei den Versuchen eingesetzte Testverfahren war der sog. Sulforhodamin B-Assay (SRB). Die mit diesem Verfahren zu bestimmende Größe ist der zelluläre Proteingehalt der Mikrotiter-Wells, der zum Vergleich der zytostatischen Aktivität verschiedener Therapeutika herangezogen wird [80].

Der Test beruht auf dem Prinzip, dass durch Zytostatika abgetötete Zellen lysieren und im weiteren Verfahren ausgespült werden. Die in den verbliebenen, vitalen Zellen vorhandenen Proteine werden mittels des Farbstoffes angefärbt und sind ein Indikator für die noch vorhandene Zellzahl und somit auch für die zytostatische Wirkung der jeweiligen Substanz [80].

Beim SRB-Assay handelt es sich um ein, insbesondere in höheren zytostatischen Konzentrationsbereichen sensitives Testverfahren, das gleichzeitig eine geringe Störanfälligkeit gegenüber exogenen Faktoren aufweist [80]. Ein weiterer Vorteil ist die Praktikabilität dieses Testprinzips, die auf einer zeitgleichen Auswertung einer größeren Anzahl von Mikrotiterplatten beruht. Außerdem ermöglicht es die Aufbewahrung der fixierten Platten über einen längeren Zeitraum bis zur definitiven Auswertung.

Aus den genannten Gründen bietet sich der SRB-Assay als präklinisches Testverfahren zur Quantifizierung von Zytostatikaaktivitäten an.

4.1.4. Die Interaktionsanalyse

Die Vorteile einer Medikamentenkombination gegenüber der Monotherapie mit den einzelnen Kombinationspartnern bestehen erstens in der möglichen Addition bzw. Multiplikation der mit den Einzelsubstanzen erreichbaren Effekte, wodurch im günstigsten Fall niedrigere Dosen der jeweiligen Therapeutika erforderlich werden, was eine Reduktion der unerwünschten Begleitwirkungen zur Folge hat. Zweitens können mit Kombinationstherapien auch gegen eine Monosubstanz bestehende Resistenzen umgangen werden, bzw. die Ausbildung solcher Resistenzen verhindert oder zumindest verzögert werden. Diese Vorteile werden z.B. in der Antibiotikatherapie zur Behandlung von Infektionen, aber auch in der Therapie maligner Neoplasien genutzt.

Um in vivo möglichst effektive Therapiekonzepte umsetzen zu können, sind präklinische in vitro-Analysen erforderlich, die die Qualität und die Quantität der Wechselwirkungen einzelner Substanzkombinationen charakterisieren.

Beim Vergleich der für diese Analysen zur Verfügung stehenden Verfahren [z.B. Methode der Multiplikation der Überlebensfraktionen, Methode der Effektsummation, Isobologrammanalyse nach Gaddum und nach Berenbaum oder der Universal Response Surface Approach (URSA)] zeigt sich, dass alleine die Isobologrammanalyse nach Berenbaum keine Dependenz von der Wirkungsweise der einzelnen Zytostatika oder deren zuvor ermittelter Dose-Response-Kurve aufweist [6,7]. Desweiteren erbringt dieses Verfahren korrekte Ergebnisse bei der Austestung von Scheinkombinationen und ist mathematisch fundiert [6,7]. Unter dieser Prämisse fiel die Wahl auf das erwähnte Analyseverfahren als das im Hinblick auf die Validität der Ergebnisse geeignetste.

4.1.5. Zytotoxizität

Bei den Zytotoxizitätstestungen der Einzelsubstanzen an der Zelllinie MB231 lagen die Konzentrationen, mit denen bei 2-stündiger Inkubation eine 50%-ige Wachstumshemmung erreicht werden konnte, zwischen 68 und 2047 $\mu\text{mol} / \text{l}$. Hierbei bewegten sich die IC₅₀-Werte von Melphalan, Cisplatin und Cyclophosphamid in einem Bereich von 68 bis 204 $\mu\text{mol} / \text{l}$, Bendamustin mit 637 $\mu\text{mol} / \text{l}$ und insbesondere Treosulfan mit 2047 $\mu\text{mol} / \text{l}$ wiesen deutlich höhere Konzentrationen auf.

Bei der Analyse der Zytostatikakombinationen zeigte sich, dass sämtliche Medikamentenpaarungen zumindest additive oder sogar synergistische Effekte erzielten, antagonistische Wirkungen traten nicht auf.

Im folgenden werden die verschiedenen Kombinationen im Detail diskutiert.

1. Isobologrammanalyse von Cisplatin / Cyclophosphamid

Die Analyse dieser Wirkstoffkombination ergab einen additiven Effekt auf das Tumorwachstum der Zelllinie MB 231. Bei einer Vorgabe von fixen Konzentrationen von Cisplatin lagen die erforderlichen Dosen von Cyclophosphamid im Bereich von 25–84 % der IC 50. Umgekehrt waren Konzentrationen von 29–64 % der IC 50 von Cisplatin notwendig.

Diese Medikamenten-Kombination wurde bereits in verschiedenen Hochdosis-Chemotherapieprotokollen eingesetzt, so z.B. von Peters in Verbindung mit BCNU nach einer konventionell dosierten CAF-Therapie [38,64].

2. Isobologrammanalyse von Cyclophosphamid / Melphalan

Die Kombination dieser beiden Zytostatika zeigte eine synergistische Wirkung auf das Zellwachstum.

Hierfür mußten die vorgegebenen Konzentrationen von Cyclophosphamid mit Melphalan-Dosen von 9–14 % der IC 50 und die fixen Konzentrationen von Melphalan mit 15–23 % der IC 50 des Cyclophosphamids kombiniert werden.

Die in dieser Analyse benötigten, sehr niedrigen Melphalan-Dosen bei Vorab-Exposition mit festgelegten Cyclophosphamid-Dosen sind konform zu der von Frei gemachten Feststellung, dass die Erstexposition mit Cyclophosphamid zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber der nachfolgend verabreichten Substanz führt, und daß Melphalan die größte Kollateralsensitivität besitzt [30].

Die Kombination von Cyclophosphamid und Melphalan wurde unter anderem in Verbindung mit Cisplatin und BCNU 1987 von Antman im Rahmen einer Phase I-Studie eingesetzt [2].

3. Isobologrammanalyse von Cisplatin / Bendamustin

Die Chemotherapeutika Cisplatin und Bendamustin erzielten in Kombination einen additiven Effekt in der Hemmung des Tumorwachstums.

In der Kombination mit festen Cisplatin-Konzentrationen lagen die Bendamustin-Dosen bei 33–82 % der IC 50, im umgekehrten Fall waren Cisplatin-Dosen von 41–80 % der IC 50 bei Vorgabe der Bendamustin-Konzentrationen notwendig.

4. Isobologrammanalyse von Cyclophosphamid / Bendamustin

Die Interaktionen der beiden Zytostatika Cyclophosphamid und Bendamustin lassen sich insgesamt als additiv charakterisieren, wobei die Kombination einer niedrigen Bendamustin-Dosis (25 %) mit einer mittleren Cyclophosphamid-Dosis (43 %) einen eher synergistischen Effekt zeigt und die Kombination einer mittleren Bendamustin-Dosis (47 %) mit einer hohen Cyclophosphamid-Dosis (75 %) eher antagonistisch wirkt.

Fixe Cyclophosphamid-Konzentrationen erforderten Bendamustin-Dosen von 47–60 % der IC 50, im Gegenzug lagen die Cyclophosphamid-Dosen bei 37–43 % der IC 50 bei festgelegten Bendamustin-Konzentrationen.

5. Isobologrammanalyse von Cisplatin / Treosulfan

Die Wirkungsweise der Medikamentenkombination Cisplatin und Treosulfan ist als synergistisch einzustufen.

Bei Vorgabe der Cisplatin-Konzentration mußten Treosulfan-Dosen von 11–55 % der IC 50 eingesetzt werden. Umgekehrt waren Cisplatin-Dosen von 9–44 % der IC 50 erforderlich, um bei festen Treosulfan-Konzentrationen einen synergistischen Effekt zu erzielen.

6. Isobologrammanalyse von Cyclophosphamid / Treosulfan

Die Wechselwirkungen von Cyclophosphamid und Treosulfan als Kombinationspartner können als Synergismus bezeichnet werden.

Hierfür mußten die festen Konzentrationen von Cyclophosphamid mit Treosulfan-Dosen von 7–16 % der IC 50 und die fixen Konzentrationen von Treosulfan mit 17–30 % der IC 50 von Cyclophosphamid kombiniert werden.

Vergleicht man diese beiden letzten Isobologramm-Analysen, die als Kombinationspartner das Treosulfan gemeinsam haben, so liegen die benötigten Dosen dieses Wirkstoffes in Verbindung mit Cyclophosphamid deutlich niedriger als in der Kombination mit Cisplatin.

Auch dieses ist ein Indiz für die bereits zuvor erwähnte hohe Kollateralsensitivitätsrate des Cyclophosphamids [30].

Zusammenfassend kann bei allen getesteten Medikamenten-Kombinationen von einem zumindest additiven, bei drei Doublets sogar von einem synergistischen Effekt ausgegangen werden. Somit würden sich insbesondere die Kombinationen Cyclophosphamid / Melphalan, Cisplatin / Treosulfan, und Cyclophosphamid / Treosulfan für den weiteren Einsatz in Chemotherapie-Protokollen anbieten.

Allerdings müssen in diesem Zusammenhang die neben der Myelosuppression in anderen Organsystemen auftretenden Nebenwirkungen berücksichtigt werden. So weisen sowohl Cyclophosphamid als auch Cisplatin eine Nephro- und Neurotoxizität auf, darüber hinaus wirkt Cisplatin in Verbindung mit anderen Alkylantien exzessiv hepatotoxisch. Auch bei den gastrointestinalen Nebenwirkungen von Cisplatin und Treosulfan kann es in Kombination zu einer Effektsummation kommen [41,51,62,74,76].

In wieweit es im klinischen Einsatz tatsächlich zur Addition der unerwünschten Wirkungen kommt, ist in vivo zu klären.

Abschließend ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich diese in vitro-Ergebnisse nur bedingt auf die tatsächlich zu erwartenden Therapieeffekte in vivo übertragen lassen, da die verabreichten Alkylantien im Körper des Patienten einer wesentlichen Biotransformation unterliegen, was zumindest teilweise zu Unterschieden in der Wirkweise in vivo zu den erzielten Ergebnissen in vitro führen kann [31].

Desweiteren darf nicht vernachlässigt werden, dass eine in vitro nicht erzeugbare Resistenz der als Monolayer wachsenden Tumorzellen gegen ein Alkylanz bei der in vivo-Anwendung desselben Zytostatikums in einer dreidimensionalen Tumorformation durchaus auftreten kann [31].

4.1.6. Hochdosis-Chemotherapie beim Mammakarzinom

Als Ende der 80er Jahre Frei eine ausgeprägte Dosis / Wirkungsbeziehung bei vielen Substanzen aus der Gruppe der Alkylantien nachweisen konnte, entwickelte man die Theorie, dass eine maximale Abtötung von Tumorzellen mit Überschreiten der letalen Dosis des Chemotherapeutikums erreicht werden könnte [31].

Gleichzeitig konnte die allen Alkylantien gemeinsame Hauptnebenwirkung – die Myelosuppression – mit dem autologen Stammzell-Support abgefangen werden.

So entstand ein neues Therapiekonzept, das die Dosisintensivierung in Verbindung mit der Stammzelltransplantation umfasste. Dieses Konzept wurde in den achtziger Jahren zunächst bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom eingesetzt, so z.B. von Cooper [35], Tannock [86], Hortobagyi [33] und Peters [65].

Die im weiteren Verlauf durchgeführten Studien zur Wirksamkeit der Hochdosis-Chemotherapie im Vergleich mit konventionell dosierten Zytostatika-Kombinationen lassen sich anhand der ausgewählten Patientinnen-Kollektive in Untersuchungen zum metastasierten und zum primären Hochrisiko-Mammakarzinom unterteilen.

4.1.6.1 Studien mit Hochdosis-Chemotherapie beim metastasierten Mammakarzinom

1993 führte Crown eine Phase II-Studie mit hochdosiertem Carboplatin in Kombination mit Etoposid durch. Ein Teil der insgesamt 46 Patientinnen hatte vor Studienbeginn bereits eine adjuvante Therapie erhalten. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten Ansprechraten der Hochdosistherapie von 42%, allerdings ausschließlich in der Gruppe der nicht vorbehandelten Patientinnen [24].

Eine südafrikanische Studie von Bezwoda 1995 an 90 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Therapiegruppe, die hochdosiert eine Kombination aus Cyclophosphamid (2400 mg/m²), Mitoxantron (35-45 mg/m²) und Etoposid (2500 mg/m²) erhalten hatte und der Vergleichsgruppe, die mit derselben Kombination, jedoch mit Vincristin anstelle von Etoposid, in konventioneller Dosierung behandelt wurde. In der Hochdosis-Gruppe wurden Gesamt-Ansprechraten von 95% (hiervon erreichten 51% Komplettremissionen) im Vergleich zu 53% in der Vergleichsgruppe (mit nur 2% Komplettremissionen) erzielt [11].

In der „Philadelphia Intergroup Study“ verglich Stadtmayer eine Hochdosis-Kombination aus Cyclophosphamid, Thiotepa und Carboplatin mit einem herkömmlichen CMF-Regime nach einer Induktion mit CAF oder CMF. Die Studie umfasste 553 Patientinnen, die in der Hochdosis-Gruppe mit 1500 mg/m² Cyclophosphamid, 125 mg/m² Thiotepa und 200 mg/m² Carboplatin behandelt wurden. Die Ergebnisse dieser Studie wiesen keinen eindeutigen Vorteil der Hochdosistherapie nach, weder in Bezug auf das tumorfreie Intervall, noch im Hinblick auf die Gesamt-Überlebenszeit [82,83].

Das französische Protocol PEGASE 04 von Lotz verwandte eine Kombination von Cyclophosphamid, Mitoxantron und Melphalan als Konsolidierungstherapie bei insgesamt 61 Patientinnen; einmal in herkömmlicher Dosierung und zum anderen als dosisintensivierte Therapie (mit 120 mg/kg Cyclophosphamid, 45 mg/m² Mitoxantron und 140 mg/m² Melphalan). Hier konnte nach einer Laufzeit von fünf Jahren kein signifikanter Unterschied in der Effektivität der beiden Behandlungsansätze hinsichtlich der Gesamtüberlebenszeit gezeigt werden, die „Time-to-Progression“ war in der Hochdosis-Gruppe jedoch deutlich verlängert [48, 49,50].

Da in den meisten bisherigen Untersuchungen die involvierten Patientinnen bereits eine chemotherapeutische Vorbehandlung mit einer konventionell dosierten Induktionstherapie erhalten hatten, so dass eine Dosisintensivierung erst im Verlauf der Behandlung einsetzte, entwarf Schmid eine Studie, bei der 93 bisher unbehandelte Patientinnen mit metastasiertem Mamma-karzinom entweder eine Standard-Therapie aus Doxorubicin und Paclitaxel oder eine Hochdosis-Therapie aus Cyclophosphamid, Mitoxantron und Etoposid sowie eine Stammzelltransplantation erhielten. Auch hier konnte in der HD-Gruppe kein Vorteil im Hinblick auf die Ansprechraten nachgewiesen werden, darüber hinaus zeigte diese Gruppe jedoch eine deutlich höhere Nebenwirkungsrate mit Myelosuppression, Infektionen, Diarrhoe, Stomatitis und Übelkeit / Erbrechen [77].

Die nachfolgende Tabelle zeigt noch einmal die verschiedenen Studien zum metastasierten Mammakarzinom mit den unterschiedlichen Therapie-Regimen im Bereich der Standard- und Hochdosis-Therapie im Überblick.

Studie	Pat.-Zahl	Hochdosis-Therapie	Standard-Therapie	Ergebnis
Bezwoda	90	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Etoposid	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Vincristin	ungültig
Stadtmauer (Philadelphia Intergroup)	553	Cyclophosphamid + Thiotepa + Carboplatin	Cyclophosphamid + Methotrexat + 5-FU	kein Vorteil der HDT
Lotz (PEGASE 04)	61	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Melphalan	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Melphalan	Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit
Schmid	93	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Etoposid	Doxorubicin + Paclitaxel	kein Vorteil der HDT

4.1.6.2 Studien mit Hochdosis-Chemotherapie beim primären Hochrisiko-Mammakarzinom

Peters führte 1993 eine Phase II-Studie mit einer Hochdosis-Konsolidierungstherapie aus Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU nach einer konventionell dosierten adjuvanten Chemotherapie (CAF-Regime) beim primären Hochrisiko-Mammakarzinom im Stadium IIa, IIb, IIIa, IIIb oder mit 10 und mehr positiven Lymphknoten an insgesamt 102 Patientinnen durch. Die Ergebnisse dieser Studie wurden mit vorhandenen Daten aus historischen Studien verglichen und zeigten einen deutlichen Rückgang der Rückfall-Häufigkeit unter der Hochdosistherapie [64].

Rodenhuis arbeitete an einer vergleichenden Studie mit 885 Patientinnen, die entweder eine konventionelle Kombination aus 5 Cyclen Cyclophosphamid, Epirubicin und 5-FU oder eine Hochdosis-Kombination einschließlich Stammzell-Support anstelle des 5. Cyclus FEC aus Cyclophosphamid (6000 mg/m²), Thiotepa (480 mg/m²) und Carboplatin (1600 mg/m²) erhielten. Diese Studie erbrachte ebenfalls keinerlei Signifikanz in Bezug auf eine Verlängerung der Überlebenszeit durch Hochdosistherapie, lediglich eine Verlängerung des tumorfreien Intervalls war nachweisbar [68,69].

Auch die Studie von Hortobagyi, bei der 78 Patientinnen mit Zustand nach primär operativer Therapie eines Mammakarzinoms mit 10 und mehr befallenen Lymphknoten oder mit Zustand nach neoadjuvanter Chemotherapie bei lokal fortgeschrittener Erkrankung und 4 und mehr positiven Lymphknoten nach einer Induktionstherapie mit 8 Cyclen CAF entweder eine Hochdosistherapie mit Cyclophosphamid, Etoposid und Cisplatin verabreicht wurde oder keine weitere Therapie erfolgte, zeigte sogar eine gering höhere Überlebensrate in der „unbehandelten“ Gruppe [34].

Eine skandinavische Studie verglich die Kombination aus Cyclophosphamid, Epirubicin und 5-FU in individuell angepasster, intensivierter Dosierung (mit C 450-1800 mg/m², E 38-120 mg/m² und F 300-600 mg/m²) mit einer hochdosierten, transplantationspflichtigen Kombination aus Cyclophosphamid, Thiotepa und Carboplatin (mit C 6000 mg/m², T 500 mg/m² und P 800 mg/m²). Im Hinblick auf das tumorfreie Intervall und die Gesamt-Überlebenszeit konnten bei den beteiligten 525 Patientinnen keine signifikanten Vorteile der Hochdosistherapie herausgestellt werden, im Gegenteil sprachen auch hier die ermittelten Zahlen eher für die individuell angepasste, niedriger dosierte Therapie [9,71].

In der CALGB Intergroup Study 9082 von Peters wurden 785 Mammakarzinom-Patientinnen zunächst mit einer Induktionstherapie aus 4 Cyclen CAF behandelt. Daran anschließend folgten hochdosierte, transplantationspflichtige Gaben von Cyclophosphamid (5625 mg/m²), Cisplatin (165 mg/m²) und BCNU (600 mg/m²) oder dieselbe Medikamentenkombination in mittlerer Dosierung (C 900 mg/m², P 90 mg/m² und B 90 mg/m²). Die Ergebnisse dieser Studie entsprachen im Wesentlichen den bereits dargestellten; es ließ sich kein signifikanter Vorteil der Hochdosistherapie ausmachen [60,63].

Die französischen Studien Pegase 01 und 06 von Roche sollten an 314 Patientinnen den Effekt einer einmaligen, abschließenden Hochdosis-Chemotherapie mit 120 mg/kg Cyclophosphamid, 45 mg/m² Mitoxantron und 140 mg/m² Melphalan nach vorausgegangenen 4 Cyclen FEC 100 bewerten, bzw. 6 Cyclen FEC 100 mit 4 Cyclen HD-EC (150 mg/m² Epirubicin und 3g/m² Cyclophosphamid) vergleichen.

Im Hinblick auf das tumorfreie und das metastasenfreie Überleben zeigten sich deutliche Vorteile in der Hochdosis-Gruppe, das Gesamtüberleben war jedoch in beiden Gruppen, der Standard- und der HD-Gruppe, identisch [66].

In der Studie von Leonard wurden 605 Patientinnen mit Mammakarzinom und 4 oder mehr positiven Lymphknoten mit einem konventionellen Therapie-regime aus 4 Cyclen Doxorubicin (75 mg/m²) gefolgt von 8 Cyclen CMF (600 mg/m² Cyclophosphamid, 50 mg/m² Methotrexat und 600mg/m² 5-FU) oder einem Hochdosis-Regime aus 4 Cyclen Doxorubicin, anschließender Gabe von einem Einzel-Cyclus Cyclophosphamid (4000 mg/m²) mit Filgrastim und abschließender Therapie mit Cyclophosphamid (6000 mg/m²) und Thiotepa (800 mg/m²) behandelt. Nach einer mittleren Untersuchungsdauer von 6 Jahren waren keine wesentlichen Unterschiede im tumorfreien und im Gesamt-Überleben auszumachen [46].

Tallman behandelte 540 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom und mindestens 10 befallenen ipsilateralen Lymphknoten mit 6 Cyclen Cyclophosphamid, Doxorubicin und 5-FU in Standard-Dosierung mit oder ohne anschließender Hochdosis-Therapie mit Cyclophosphamid und Thiotepa plus Stammzell-Transplantation. Ein signifikanter Unterschied zugunsten der Hochdosis-Therapie in Bezug auf das krankheitsfreie und das Gesamt-Überleben ließ sich auch hier nicht nachweisen. Lediglich der Zeitraum bis zum Wiederauftreten der Erkrankung war in der Hochdosis-Gruppe größer [85].

Eine weitere Untersuchung von Coombes an 281 Patientinnen mit 4 oder mehr befallenen Lymphknoten, die entweder einer konventionell dosierten Therapie mit 6 Cyclen FEC (5-FU, Epirubicin und Cyclophosphamid) oder einer Therapie mit 3 Cyclen FEC und anschließender Hochdosis-Gabe von Cyclophosphamid, Thiotepa und Carboplatin zugeführt wurden, konnte nach einer Dauer von 68 Monaten ebenfalls keine Vorteile der Hochdosis-Therapie belegen [20].

Ähnliche Ergebnisse zeigte die Studie von Zander, in der 307 Patientinnen mit mindestens 10 befallenen Lymphknoten nach einer Vorbehandlung mit 4 Cyclen Epirubicin (90 mg/m²) und Cyclophosphamid (600 mg/m²) entweder eine Standard-Therapie mit 3 Cyclen Cyclophosphamid (500 mg/m²), Methotrexat (40 mg/m²) und 5-FU (600 mg/m²) oder eine Hochdosis-Therapie mit Cyclophosphamid (1500 mg/m²), Thiotepa (150 mg/m²) und Mitoxantron (10 mg/m²) einschließlich Stammzell-Support erhielten [96].

Die einzige Studie, die deutliche Vorteile der dosisintensiven Chemotherapie nachweisen konnte, war die südafrikanische Studie von Bezwoda. Diese Studie wurde jedoch diskreditiert, nachdem Bezwoda einige Jahre nach Veröffentlichung seiner Daten zugeben musste, dass die tatsächliche Durchführung der Studie in Bezug auf die verwendeten Therapieregime von seinen Berichten abwich [93].

Die nachfolgende Tabelle zeigt noch einmal die verschiedenen Studien zum primären Hochrisiko-Mammakarzinom mit den unterschiedlichen Therapie-Regimen im Bereich der Standard- und Hochdosis-Therapie im Überblick.

Studie	Pat.-Zahl	Hochdosis-Therapie	Standard-Therapie	Ergebnis
Rodenhuis (Dutch)	885	Cyclophosphamid + Thiotepa + Carboplatin	Cyclophosphamid + Epirubicin + 5 FU	Verlängerung des tumorfreien Intervalls
Hortobagyi	78	Cyclophosphamid + Etoposid + Cisplatin	Cyclophosphamid + Adriamycin + 5 FU	kein Vorteil der HDT
Scandinavian	525	Cyclophosphamid + Thiotepa + Carboplatin	Cyclophosphamid + Epirubicin + 5 FU	kein Vorteil der HDT
Peters (CALGB 9082)	785	Cyclophosphamid + Cisplatin + BCNU	Cyclophosphamid + Cisplatin + BCNU	kein Vorteil der HDT
Roche (PEGASE 01 + 06)	314	Cyclophosphamid + Mitoxantron + Melphalan	Cyclophosphamid + Epirubicin + 5 FU	Verlängerung des tumorfreien Intervalls
Tallman	540	Cyclophosphamid + Thiotepa	Cyclophosphamid + Doxorubicin + 5 FU	Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit
Leonhard	605	Cyclophosphamid + Thiotepa	Cyclophosphamid + Methotrexat + 5-FU	kein Vorteil der HDT
Coombes	281	Cyclophosphamid + Thiotepa + Carboplatin	Cyclophosphamid + Epirubicin + 5 FU	kein Vorteil der HDT
Zander	307	Cyclophosphamid + Thiotepa + Mitoxantron	Cyclophosphamid + Methotrexat + 5 FU	kein Vorteil der HDT

Bei eingehender Betrachtung der dargestellten Studien zeigt sich, dass aus verschiedenen Gründen keine direkte Vergleichbarkeit besteht.

Zum einen umfassen diese Studien zum Teil nur relativ geringe Fallzahlen; die größten Untersuchungen sind die CALGB Intergroup Study 9082 mit 785 Patientinnen [60,63] und die Dutch Study mit 885 Patientinnen [68,96], wohingegen kleinere Studien unter 100 Fälle beinhalten.

Daneben unterschieden sich die Auswahlkriterien der Patientinnen und die Sorgfältigkeit der Voruntersuchungen zur Ermittlung des Tumor-Stagings teilweise erheblich. So wurden für einige Studien die potentiellen Teilnehmerinnen intensiven radiologischen Screenings zur Detection von Metastasen unterzogen. Andere Studien hatten Altersgrenzen als Ein- bzw. Ausschlusskriterien. Auch der Rezeptorstatus der untersuchten Patientinnen fand nicht immer in gleichem Maße Berücksichtigung [67,84,87,92].

Den größten Unterschied beim Vergleich der genannten Studien machten jedoch die zum Teil erheblich differierenden Medikamenten-Dosen in den Hochdosis-Gruppen. So bewegten sich zum Beispiel die verabreichten Dosen von Cyclophosphamid zwischen 1500 mg/m² und 6000 mg/m², wobei man bei einer Dosis von 1500 mg/m², was nur gut dem Doppelten der Standard-Dosis entspricht, sicher nicht von Hochdosis sprechen kann. Andererseits verwandte die skandinavische Studie von Bergh eine intensivisierte Therapie als Kontrollgruppe anstelle einer konventionell dosierten Chemotherapie. Darüber hinaus wurden in den verschiedenen Untersuchungen unterschiedlichste Therapie-Regime mit ebenfalls unterschiedlicher Effektivität im Hinblick auf die Anti-Tumorstudie eingesetzt. Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass in den Standard-Therapien, die nicht selten 8 oder 9 Cyclen umfassten, häufig deutlich höhere kumulative Dosen der Chemotherapeutika erreicht wurden als in den in der Regel nur wenige Cyclen andauernden Hochdosis-Therapien [67].

Dennoch sind die Ergebnisse sowohl bei Hochrisiko-Karzinomen wie auch beim metastasierten Mammakarzinom im wesentlichen identisch; keine der Studien konnte im Hinblick auf die tumorfreie Überlebenszeit noch auf das Gesamtüberleben eine signifikante Überlegenheit der Hochdosistherapie herausstellen.

Im Gegenteil wiesen die Patientengruppen mit der dosisintensivierten Therapie z.T. nicht unerhebliche, therapiebedingte Sterblichkeitsraten auf [67,84,92].

Ungeachtet dieser eher ernüchternden Erkenntnisse ließ sich im Zuge der Studienauswertungen ein Patientenkollektiv ausmachen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit vom Einsatz einer Hochdosistherapie profitiert.

Die Eigenschaften dieser Subgruppe lassen sich folgendermaßen definieren :

Die infrage kommenden Patientinnen müssen in guter klinischer Verfassung sein, nur wenige nachgewiesene Metastasen haben und auf konventionell dosierte Chemotherapie gut ansprechen [67,79]. Außerdem zeigte sich, dass Patientinnen mit einer Überexpression von HER-2/neu im Besonderen günstig auf dosisintensivierte Therapien ansprechen [55,89].

Eine weitere, noch nicht definitiv zu beantwortende Frage liegt letztendlich in der Art des Verabreichens der ausgewählten Chemotherapeutika – in Kombination oder als Sequenz. Vorteile der sequentiellen Gabe liegen in der potentiellen Reduktion der überlappenden Toxizität bei gleicher Effektivität [17,37,52]. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass eine dosisdichte Applikation der Therapie zu einer deutlichen Verbesserung des tumorfreien und des Gesamt-Überlebens führt bei gleichzeitig möglicher Reduktion unerwünschter Nebenwirkungen wie gravierender Neutropenien [17].

Während sich multiple Studien mit der Anwendung von Hochdosis-Therapieprotokollen beschäftigt haben, die überwiegend aus Kombinationen verschiedener Alkylantien bestanden, haben in den letzten Jahren neue Wirkstoffe Anwendung in der Behandlung des Mammakarzinoms gefunden.

Die Verwendung von Epirubicin und den Taxanen Docetaxel und Paclitaxel im Rahmen von Polychemotherapien, insbesondere in dosisdichter Applikation, nicht nur beim Mammakarzinom, sondern auch bei anderen Neoplasien wie dem Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphom, Ovarialkarzinomen und Sarkomen, konnte positive Auswirkungen auf die Überlebenszeit demonstrieren [8,14,21,25,58,94].

Hierbei hat sich eine Dosierung/ Cyclus von 175 mg/m² Paclitaxel und 400 mg/m² Docetaxel als optimal hinsichtlich der gewünschten Effektivität bei gleichzeitig tolerabler (Neuro-) Toxizität erwiesen [58,94].

Eine Phase II-Studie mit Vinorelbin und Trastuzumab (Herceptin) als initiale Therapie bei HER-2 positiven Patientinnen sowie Untersuchungen mit Trastuzumab, Paclitaxel und Epirubicin als neoadjuvante Therapie beim primären Mammakarzinom und hochdosiertem Cyclophosphamid, Cisplatin und BCNU in Kombination mit Trastuzumab beim fortgeschrittenen Mammakarzinom bieten ebenfalls gute Perspektiven [14,39,59].

Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und nur wenigen, durch chirurgische oder radiotherapeutische Maßnahmen gut zu erreichenden Metastasen profitieren von einer lokalen Konsolidierung, ebenso wie Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom nach neoadjuvanter Therapie und Mastektomie durch eine intensive Bestrahlung eine Reduktion lokoregionaler Rezidive erfahren [12,36].

In Verbindung mit operativer Therapie und postoperativer Bestrahlung sollten zukünftig (neo-) adjuvante Chemotherapie-Regime zum Einsatz kommen, die individuell angepasste, dosisintensivierte und G-CSF-unterstützte oder Stammzell-gestützte, hochdosierte Medikamenten-Kombinationen aus Alkylantien, Anthrazyklinen und Taxanen, sowie bei entsprechendem Rezeptorstatus auch Hormone bzw. Hormonrezeptor-Modulatoren enthalten [1,16,26,90].

5. Zusammenfassung der Arbeit

Das Mammakarzinom der Frau ist eine Tumorerkrankung mit einer relativ hohen Inzidenz und Prävalenz und einer Mortalitätsrate von 50 %. Mit dem Ziel effektive Chemotherapie-Regime zur Verlängerung der tumorfreien sowie auch der Gesamt-Überlebenszeit zu entwickeln, fanden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Therapieansätzen statt.

Ziel dieser Arbeit war es, additive bzw. synergistische Wirkprofile bei verschiedenen Alkylantien-Doublets zu eruieren, um diese dann in Hochdosis-Chemotherapien einbinden zu können.

Aufgrund ihrer speziellen biochemischen Eigenschaften haben sich die Alkylantien in der Behandlung des Mammakarzinoms zu einem Eckpfeiler in der adjuvanten (Hochdosis-)Therapie entwickelt. Die ersten Untersuchungsergebnisse zur Hochdosistherapie zeigten im Vergleich zu bereits vorliegenden historischen Daten deutlich bessere Ansprechraten und ermutigten zum verstärkten Einsatz dieser Therapieform. Daß diese ersten positiven Ergebnisse wahrscheinlich nur das Resultat von Patientenselektion waren, wurde erst im weiteren Verlauf deutlich, als mehr als ein halbes Dutzend vergleichender Studien keinen signifikanten Vorteil der Hochdosistherapie belegen konnte. Allerdings gab es durchaus Patientenkollektive, die von dieser speziellen Behandlung profitierten.

Die wesentliche Aufgabe in der erfolgreichen Behandlung des Mammakarzinoms wird es sein, das Tumorverhalten und die spezielle Therapierbarkeit eines individuellen Patienten vorherzusagen und in jedem einzelnen Fall die optimale Therapie zu finden. In diesem Kontext haben sicherlich auch die Hochdosis-Kombinationen aus verschiedenen Alkylantien in Verbindung mit Substanzen anderer Stoffgruppen ihren Platz; nicht als Ersatz, sondern als Ergänzung der konventionellen Chemotherapie. Unter diesem Gesichtspunkt sind grundsätzlich alle in dieser Arbeit getesteten Alkylantien-Doublets geeignet, da keine der Wirkstoff-Paarungen antagonistisch wirkt. Insbesondere empfehlen sich hier allerdings die Kombinationen aus Cisplatin / Treosulfan, Cyclophosphamid / Treosulfan und Cyclophosphamid / Melphalan, die in ihrer Wirkungsweise einen Synergismus erzielen. Vor allem das Treosulfan hat sich in neueren Studien als viel versprechende Haupt-Komponente in Hochdosis-Therapien gezeigt [5,44,75,91].

6. Anhang

6.1. Quellen

In dieser Arbeit wurde auf folgende Quellen Bezug genommen :

1. Aapro, M.S., (2001):
Adjuvant therapy of primary breast cancer: A review of key findings from the 7th international conference, St.Gallen, February 2001.
The Oncologist, Vol. 6, No. 4, 376-385.
2. Antman, K., Eder, J.P., Elias, A., Shea, T., Peters, W.P., (1987):
High-dose combination alkylating agent preparative regimen with autologous bone marrow support: The Dana-Farber Cancer Institute experience.
Cancer Treat. Rep., Vol. 71, No. 2, 119-125.
3. Antman, K.H., Rowlings, P.A., Vaughan, W.P., (1997):
High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem- cell support for breast cancer in North America.
J. Clin. Oncol., No. 15, 1870-1879.
4. Bässler, R., (1994):
Pathologie des Mammakarzinoms.
In: Roth, S.L. (Hrsg.): Klinische Onkologie 94/95, S.216-223.
5. Baynes, R.D., Parchment, R., Dansey, R.D., Klein, J.L., (2000):
Phase I evaluation of high dose melphalan, DTIC and treosulfan in previously treated metastatic breast and ovarian cancer.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. Vol. 19, No. 148 a.
6. Berenbaum, M.C., (1985):
The expected effect of a combination of agents: The general solution.
L. Theor. Biol., Vol. 114, 413-431.
7. Berenbaum, M.C., (1989):
What is synergy ?
Pharmacol. Rev., Vol. 41, 93-141.

8. Bergh, J., (2003):
Best use of adjuvant systemic therapies II, chemotherapy aspects: dose of chemotherapy-cytotoxicity, duration and responsiveness.
Breast., Vol. 12, No. 6, 529-537.
9. Bergh, J., Wiklund, T., (2000):
Tailored fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide compared with marrow-supported high-dose chemotherapy as adjuvant treatment for high-risk breast cancer: a randomised trial. Scandinavian Breast Group 9401 study.
Lancet, Vol. 365, 1384-1391.
10. Bezwoda, W.R., Seymour, L., Ariad, S., (1992):
High-dose etoposide in treatment of metastatic breast cancer.
Oncology, Vol. 49, No. 2, 104-107.
11. Bezwoda, W.R., Seymour, L., Dansey, R.D., (1995):
High-dose chemotherapy with hematopoietic rescue as primary treatment for metastatic breast cancer: A randomized trial.
J. Clin. Oncol., Vol. 13, No. 10, 2483-2489.
12. Bojko, P., Welt, A., Schleucher, N., Borquez, D., Scheulen, M.E., (2004):
High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in patients with oligometastatic breast cancer.
Bone Marrow Transplant., Vol. 34, 637-643.
13. Bonadonna, G., Valagussa, P., (1981):
Dose-response effect of adjuvant chemotherapy in breast cancer.
N. Engl. J. Med., Vol. 304, 10-15.
14. Buzdar, A.U., Ibrahim, N.K., Francis, D., Booser, D.J., (2005):
Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in HER2+ operable breast cancer.
J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 16, 3676-3685.
15. Cailleau, R., (1974):
Primary cells an cell lines : MDA-MB-231.
J.Natl. Cancer inst., Vol. 53, 661-674.

16. Chabner, B.A., (2002):
Cytotoxic agents in the era of molecular targets and genomics.
The Oncologist, Vol. 7, Suppl. 3, 34-41.
17. Citron, M.L., Berry, D.A., Hudis, C., Winer, E.P., (2003):
Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741 / CALGB Trail 9741.
J. Clin. Oncol., Vol. 21, No. 8, 1431-1439.
18. Colvin, M., (1982):
The Alkylating agents.
In: Chabner, B.A., (Hrsg): Pharmacologic principles of cancer treatment., S.276-306.
Saunders.
19. Colvin, M., Chabner, B.A., (1990):
Alkylating agents.
In: Chabner, B.A., Collins, J.M. (Hrsg): Cancer chemotherapy, Principles and Practice., S.276-313.
J.B. Lippincott Company.
20. Coombes, R.C., Howell, A., Emson, M., Peckitt, C., (2005):
high dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation as adjuvant therapy for primary breast cancer patients with four or more lymph nodes involved: long-term results of an international randomised trial.
Annals of Oncology, Vol. 16, No. 5, 726-734.
21. Cristofanilli, M., Hortobagyi, G.N., (2004):
Breast cancer highlights: key findings from the San Antonio Breast Cancer Symposium: A U.S. perspective.
The Oncologist, Vol. 9, No. 4, 471-478.
22. Crown, J., (1998):
Evolution in the treatment of advanced breast cancer.
Semin. Oncol., Vol. 25, No. 5, Suppl. 12, 12-17.

23. Crown, J., (1999):
A review of the efficacy and safety of docetaxel as monotherapy in metastatic breast cancer.
Semin. Oncol., Vol. 26, No. 1, Suppl. 3, 5-9.
24. Crown, J., Hakes, T., Reichman, B., Lebwohl, D., Seidman, A., (1993):
Phase II trial of carboplatin and etoposide in metastatic breast cancer.
Cancer, Vol. 71, No. 4, 1254-1257.
25. Crown, J., O'Leary, M., Ooi, W.S., (2004):
Docetaxel and Paclitaxel in the treatment of breast cancer:
A review of clinical experience.
The Oncologist, Vol. 9, Suppl. 2, 24-32.
26. Esteva, F.J., Valero, V., Pusztai, L., (2001):
Chemotherapy of metastatic breast cancer: What to expect in 2001 and beyond.
The Oncologist, Vol. 6, No. 2, 133-146.
27. Frei III, E., (1985):
Curative cancer chemotherapy.
Cancer research, Vol. 45, 6523-6537.
28. Frei III, E., Canellos, G.P., (1980):
Dose: a critical factor in cancer chemotherapy.
Am. J. Med., Vol. 69, 585-594.
29. Frei III, E., Cucchi, C.A., Rosowsky, A., Tantravahi, R., Bernal, S., Ervin, T.J., Ruprecht, R.M., Haseltine, W.A., (1985):
Alkylating agent resistance: In vitro studies with human cell lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, 2158-2162.
30. Frei III, E., Holden, S.A., Gonin, R., Waxman, D.J., Teicher, B.A., (1993):
Antitumor alkylating agents: In vitro cross-resistance and collateral sensitivity studies.
In: Cancer chemotherapy and pharmacology., Vol. 33, S.113-122.
Springer Verlag.
31. Frei III, E., Teicher, B.A., Holden, S.A., Cathcart, K.N.S., Wang, Y., (1988):
Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose.
Cancer research, Vol. 48, 6417-6423.

32. Harstrick, A., (1998):
Stammzellgestützte Hochdosistherapie bei soliden Tumoren.
In: Seeber, S., Schütte, J. (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie., 3. Aufl.,
S.102-108.
Springer Verlag.
33. Hortobagyi, G.N., Bodey, G.P., Buzdar, A.U., (1987):
Evaluation of high-dose versus standard FAC chemotherapy for advanced
breast cancer in protected environment units: a prospective randomized
study.
J. Clin. Oncol., No. 5, 354-364.
34. Hortobagyi, G.N., Buzdar, A.U., Champlin, R., (1998) :
Lack of efficacy of adjuvant high-dose tandem combination chemotherapy
for high-risk primary breast cancer.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 17, No. 123a.
35. Hryniuk, W., Bush, H., (1984):
The importance of dose intensity in chemotherapy of metastatic breast
cancer.
J. Clin. Oncol., No. 2, 1281-1288.
36. Huang, E.H., Tucker, S.L., Strom, E.A., Mc Neese, M.D., (2004):
Postmastectomy radiation improves local-regional control and survival for
selected patients with locally advanced breast cancer treated with
neoadjuvant chemotherapy and mastectomy.
J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 1, 4691-4699.
37. Hudis, C., Fornier, M., Riccio, L., Lebwohl, D., Crown, J., (1999):
5-year results of dose-intensive sequential adjuvant chemotherapy for
women with high-risk node-positive breast cancer: A phase II study.
J. Clin. Oncol., Vol. 17, No. 4, 1118.
38. Hurd, D.D., Peters, W.P., (1995):
CALGB Protocol 9082.
J. Natl. Cancer Inst. Monography, No. 19, 41-44.

39. Jahanzeb, M., Mortimer, J.E., Yunus, F., Irwin, D.H., (2002):
Phase II trial of weekly Vinorelbine and Trastuzumab as first-line therapy
in patients with HER2+ metastatic breast cancer.
The Oncologist, Vol. 7, No. 5, 410-417.
40. Jonat, W., Eidtmann, H., (1994):
Die Chemo- und die Hormontherapie des Mammakarzinoms.
In: Roth, S.L. (Hrsg.): Klinische Onkologie 94/95., S.236-239.
41. Jones, R.B., Shpall, E.J., Ross, M., Coniglio, D., Affronti, M.L., Peters,
W.P., (1990):
High-dose carboplatin, cyclophosphamide and BCNU with autologous
bone marrow support: excessive hepatic toxicity.
Cancer Chemother. Pharmacol., Vol. 26, No. 2, 155-156.
42. Klaassen, U., Seeber, S.,(1998):
Mammakarzinom.
In: Seeber, S., Schütte, J. (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie., 3. Aufl.,
S.1068-1104.
Springer Verlag.
43. Kobayashi, H., Man, S., Graham, C.H, Kapitain, S.J., Teicher, B.A.,
Kerbel, A.S., (1993):
Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, 3294-3298.
44. Koenigsmann, M., Mohren, M., Jentsch-Ullrich, K., Franke, A., (2004):
High-dose treosulfan in patients with relapsed or refractory high-grade
lymphoma receiving tandem autologous blood stem cell transplantation.
Bone Marrow Transplant., Vol. 34, No. 6, 477-483.
45. Landis, S.H., Murray, T., Bolden, S., (1999):
Cancer statistics.
CA Cancer J. Clin., Vol. 49, 8-31.

46. Leonard, R.C., Lind, M., Twelves, C., Coleman, R., van Belle, S., (2004):
Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients:
A randomized trial.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 96, No. 14, 1076-1083.
47. Leonard, R.C.F., Lind, M., Twelves, C., Coleman, R., (2004):
Conventional adjuvant chemotherapy versus single-cycle, autograft-supported, high-dose, late-intensification chemotherapy in high-risk breast cancer patients:
A randomised trial.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 96, No. 14, 1076-1083.
48. Lotz, J.-P., Cure, H., Janvier, M., (1999) :
High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer : results of the French Protocol PEGASE 04.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 18, No. 43a.
49. Lotz, J.P., Cure, H., Janvier, M., Asselain, B., (1999):
Intensive chemotherapy and autograft of hematopoietic stem cells in the treatment of metastatic cancer: results of the national protocol PEGASE 04.
Hematol. cell Ther., Vol. 41, No. 2, 71-74.
50. Lotz, J.P., Cure, H., Janvier, M., Asselain, B., (2005):
High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell transplantation for metastatic breast cancer patients: final results of the french multicentric randomised CMA/PEGASE 04 protocol.
Eur. J. Cancer, Vol. 41, No. 1, 71-80.
51. Meisenberg, B., Lassiter, M., Hussein, A., Ross, M., Vredenburgh, J.J., Peters, W.P., (1994):
Prevention of hemorrhagic cystitis after high-dose alkylating agent chemotherapy and autologous bone marrow support.
Bone Marrow Transplant., Vol. 14, No. 2, 287-291.

52. Miles, D., von Minckwitz, G., Seidman, A.D., (2002):
Combination versus sequential single- agent therapy in metastatic breast cancer.
The Oncologist, Vol. 7, Suppl. 6, 13-19.
53. Mosny, D., (1994):
Techniken der brusterhaltenden Therapie beim Mammakarzinom.
In: Roth, S.L. (Hrsg.): Klinische Onkologie 94/95., S.224-226.
54. Müller, M., (1994):
Chirurgie, 2. Aufl., S.129-133.
55. Muss, H.B., Thor, A., Berry, D.A., (1994):
c erB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer.
N. Engl. J. Med., Vol. 330, 1260-1266.
56. Mutschler, E., (1991):
Akylierende Zytostatika.
In: Mutschler, E.: Arzneimittelwirkungen., 6. Auflage, S.668-672.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
57. Neumann, H.-G., (1977):
Entstehung und Behandlung von Tumoren.
In: Forth, Henschler (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie., 2. Aufl., S.565-571.
B.I. Wissenschaftsverlag.
58. Nieto, Y., Shpall, E.J., Bearman, S.E., McSweeney, P.A., (2005):
Phase I and pharmacokinetic study of docetaxel combined with melphalan and carboplatin, with autologous hematopoietic progenitor cell support, in patients with advanced refractory malignancies.
Biol. Blood Marrow Transplant., Vol. 11, No. 4, 297-306.
59. Nieto, Y., Vredenburgh, J.J., Shpall, E.J., Bearman, S.E., (2004):
Phase II feasibility and pharmacokinetic study of concurrent administration of trastuzumab and high-dose chemotherapy in advanced HER2+ breast cancer.
Clinical Cancer Research, Vol. 10, 7136-7143.

60. Peters, W.P., (1999):
A prospective, randomized comparison of two doses of combination alkylating agents as consolidation after CAF in high-risk primary breast cancer involving ten or more axillary lymph nodes: preliminary results of CALGB 9082.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 8, No. 1a.
61. Peters, W.P., Dansey, R.D., Klein, J.L., Baynes, R.D., (2000):
High-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell transplantation in the treatment of breast cancer.
The Oncologist, Vol. 5, No. 1, 1-13.
62. Peters, W.P., Eder, J.P., Henner, W.D., Schryber, S., (1986):
High-dose combination alkylating agents with autologous bone marrow support:
A Phase 1 trial.
J. Clin. Oncol., Vol. 4, No. 5, 646-654.
63. Peters, W.P., Rosner, G.L., Vredenburgh, J.J., Shpall, E.J., (2005):
Prospective, randomized comparison of high-dose chemotherapy with stem-cell support versus intermediate-dose chemotherapy after surgery and adjuvant chemotherapy in women with high-risk primary breast cancer: a report of CALGB 9082, SWOG 9114 and NCIC MA-13.
J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 10, 21191-2200.
64. Peters, W.P., Ross, M., Vredenburgh, J.J., Meisenberg, B., (1993):
High-dose chemotherapy and autologous bone marrow support as consolidation after standard-dose adjuvant therapy for high-risk primary breast cancer.
J. Clin. Oncol., Vol. 11, No. 6, 1132-1143.
65. Peters, W.P., Shpall, E.J., Jones, R.B., (1988):
High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer.
J. Clin. Oncol., Vol. 6, No. 9, 1368-1376.

66. Roche, H., Viens, P., Biron, P., Lotz, J.P., Asselain, B., (2003) :
High-dose chemotherapy for breast cancer : the french PEGASE
experience.
Cancer Control, Vol. 10, No. 1, 42-47.
67. Rodenhuis, S., (2000):
The status of high-dose chemotherapy on breast cancer.
The Oncologist, Vol. 5, No. 5, 369-375.
68. Rodenhuis, S., Bontenbal, M., Beex, L., Wagstaff, J., (2003):
High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for high-risk
breast cancer.
N. Engl. J. Med., Vol. 349, No. 1, 7-16.
69. Rodenhuis, S., Richel, D.J., van der Wall, E., (1998):
Randomized trial of high-dose chemotherapy and hematopoietic
progenitor-cell support in operable breast cancer with extensive axillary
lymph-node involvement.
Lancet, Vol. 352, 515-521.
70. Sauer, R., Seegenschmiedt, M.H., Strnad, V., (1994):
Adjuvante Strahlentherapie des Mammakarzinoms.
In: Roth, S.L. (Hrsg.): Klinische Onkologie 94/95., S.227-235.
71. Scandinavian Breast Cancer Study Group 9401, (1999):
Results from a randomized adjuvant breast cancer study with high-dose
chemotherapy with CTCb supported by autologous bone marrow stem
cells versus dose escalated and tailored FEC therapy.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 18, No. 2a.
72. Schabel, jr., F.M., Trader, M.W., Laster, jr., W.R., Wheeler, G.W., Witt,
M.H., (1978):
Patterns of resistance and therapeutic synergism among alkylating agents.
In: Fundamentals in cancer chemotherapy - antibiotics chemotherapy.,
Vol. 23, S.200-215.
Karger, Basel.

73. Schaudig, A., (1993):
Mamma.
In: Heberer, G., Köle, W., Tscherne, H., (Hrsg.): Chirurgie., 6. Aufl., S.318-330.
Springer Verlag.
74. Scheulen, M.E., (1998):
Hochdosistherapiekonzepte.
In: Seeber, S., Schütte, J. (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie., 3. Aufl., S.88-94.
Springer Verlag.
75. Scheulen, M.E., Hilger, R.A., Oberhoff, C., Casper, J., (2000):
Clinical Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of high-dose chemotherapy with treosulfan and autologous peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced malignancies.
Clinical Cancer Research, Vol. 6, 4209-4216.
76. Scheulen, M.E., Wießler, M., (1998):
Antineoplastisch wirksame Substanzen.
In: Seeber, S., Schütte, J. (Hrsg.): Therapiekonzepte Onkologie., 3. Aufl., S.38-87.
Springer Verlag.
77. Schmid, P., Schippinger, W., Nitsch, T., Huebner, G. (2005):
Up-front tandem high-dose chemotherapy compared with standard chemotherapy with doxorubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer: results of a randomised trial.
J. Clin. Oncol., Vol. 23, No. 3, 432-440.
78. Schmidt-Matthiesen, H., von Fournier, D., Hepp, H., Hirsch, H.A., Taubert, H.-D., (1994):
Mammakarzinom.
In: Schmidt-Matthiesen, H. (Hrsg.): Gynäkologie und Geburtshilfe., 8. Aufl., S.496-505.
Schattauer.

79. Schneeweiss, A., Hensel, M., Sinn, P., Khbeis, T., Haas, R., (2002):
Characteristics associated with long-term progressive-free survival following high-dose chemotherapy in metastatic breast cancer and influence of chemotherapy dose.
Annals of Oncology, No. 13, 679-688.
80. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks A., (1990):
New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.
J. Natl. Cancer Inst., Vol. 82, No. 13, 1107-1112.
81. Skipper, H.E., (1974):
Combination Therapy: Some concepts and results.
Cancer chemotherapy reports part 2, Vol. 4, No.1, 137-145.
82. Stadtmauer, E.A., O'Neill, A., Goldstein, L.J., (1999):
Phase III randomized trial of high-dose chemotherapy and stem cell support shows no difference in overall survival or severe toxicity compared with maintenance chemotherapy with cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil for women with metastatic breast cancer who are responding to conventional chemotherapy; the "Philadelphia" Intergroup Study (PBT-1).
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 18, No. 1a.
83. Stadtmauer, E.A., O'Neill, A., Goldstein, L.J., (2000):
Conventional-dose chemotherapy compared with high-dose chemotherapy plus autologous hematopoietic stem-cell transplantation for metastatic breast cancer.
Philadelphia Bone Marrow Transplant Group.
N. Engl. J. Med., Vol. 342, No. 15, 1069-1076.
84. Subramanyan, S., Kennedy, M.J., (1998):
Breast cancer: High-dose therapy.
The Oncologist, Vol. 3, No. 5, 289-299.
85. Tallman, M.S., Gray, R.G., Robert, N.J., (2003):
Conventional adjuvant chemotherapy with or without high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation in high-risk breast cancer.
N. Engl. J. Med., Vol. 349, No. 1, 17-26.

86. Tannock, I.F., Boyd, N.F., DeBoer, G., (1988):
A randomized trial of two dose levels of cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil chemotherapy for patients with metastatic breast cancer.
J. Clin. Oncol., No. 6, 1377-1387.
87. Tartarone, A., Romano, G., Galasso, R., Iodice, G., D' Arena, G., (2003):
Should we continue to study high-dose chemotherapy in metastatic breast cancer patients ? A critical review of the published data.
Bone Marrow Transplant., Vol. 31, No. 7, 525-530.
88. Teicher, B.A., Holden, S.A., Eder, J.P., (1989):
Influence of schedule on alkylating agent cytotoxicity in vitro and in vivo.
Cancer Res., No. 49, 5994-5998.
89. Thor, A.D., Budman, D.R., Berry, D.A., (1997):
Selecting patients for higher dose adjuvant CAF: c-erbB-2, p53, dose and dose intensity in stage II, node+ breast cancer (CALGB 8869 and 8541).
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., Vol. 16, No. 452.
90. Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., Viale, G., (2005):
Breast cancer
Lancet, Vol. 365, 1727-1741.
91. Wagner, H.M., Baumgart, J., Andreesen, R., Reichle, A., (2000):
Dose-escalation of treosulfan in a high-dose-protocol:
A classical alkylating agent new in high-dose combination chemotherapy.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. Vol. 19, No. 54 a.
92. Weiss, R.B., (1999):
The randomized trials of dose-intensive therapy for breast cancer: What do they mean for patient care and where do we go from here ?
The Oncologist, Vol. 4, No. 6, 450-458.
93. Weiss, R.B., Rifkin, R.M., Stewart, F.M., (2000):
High-dose chemotherapy for high-risk primary breast cancer:
an on-site review of the Bezwoda study.
Lancet, Vol. 355, No. 9208, 999-1003.

94. Winer, E.P., Berry, D.A., Woolf, S., Duggan, D., (2004):
Failure of higher-dose paclitaxel to improve outcome in patients with
metastatic breast cancer: cancer and leukemia group B trial 9342.
J. Clin. Oncol., Vol. 22, No. 11, 2061-2068.
95. Wittekind, C.H., Riede, U.N., (1989):
Brustdrüse.
In: Riede, U.N., Schaefer, H.E., Wehner, H. (Hrsg.): Allgemeine und
spezielle Pathologie., 2. Aufl., S.871-877.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
96. Zander, A.R., Kröger, N., Schmoor, C., Krüger, W., Möbus, V., (2004):
High-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem-cell support
compared with standard dose chemotherapy in breast cancer patients with
10 or more positive lymph nodes: First results of a randomized trial.
J. Clin. Oncol., Vol. 22, No. 12, 2273-2283.

6.2. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5 – Fluorouracil
BCNU	Carmustin
CAF	Kombination aus Cyclophosphamid, Adriamycin und 5-Fluorouracil
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CMF	Kombination aus Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FEC	Kombination aus Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid
Gy	Gray, Energieeinheit ionisierender Strahlung
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
IC x	Inhibitorische Konzentration eines Zytostatikums, die x % Wachstumshemmung erzielt
L –15	Leibowitz-Medium
PBS	Phosphate Buffer Saline
PBSCT	Periphere Blutstammzell-Transplantation
SRB	Sulforhodamin B
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

7. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Andreas Harstrick für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Siegfried Seeber danke ich für die wohlwollende Unterstützung.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Britta Sender, geb. Hoffmann
Wohnort: Hattingen
Geburtstag: 17.04.1971
Geburtsort: Recklinghausen
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch
Konfession: evangelisch
Eltern: Heidrun Hoffmann, geb. Nierhaus
Friedhelm Hoffmann

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule Lutherschule Waltrop
1981-1990 Theodor-Heuss-Gymnasium Waltrop
1990 Abitur

Studium:

1990-1997 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Essen
1997 Abschluß der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit:

1997-2002 Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung,
St. Josef-Hospital Essen-Kupferdreh
2002 Anerkennung als Fachärztin für Chirurgie
seit 2002 Assistenzärztin in der Orthopädischen Abteilung,
St. Johannes-Hospital Duisburg-Hamborn